

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 894 967

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

05 13029

⑤① Int Cl⁸ : C 07 H 21/00 (2006.01), C 12 N 15/45, 15/63, A 61 K 31/71, 39/155, A 61 P 31/14, 37/04

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ ARN INTERFERENTS CIBLANT LE GENE DE LA NUCLEOPROTEINE DE MORBILLIVIRUS.

②② Date de dépôt : 21.12.05.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *CENTRE DE COOPERATION
INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT
Etablissement public à caractère industriel et
commercial — FR.*

⑦② Inventeur(s) : ALBINA EMMANUEL, LIBEAU
GENEVIEVE, KEITA DJENEBA et SEVRAN DE
ALMEIDA RENATA.

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 22.06.07 Bulletin 07/25.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 22.02.08 Bulletin 08/08.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

FR 2 894 967 - B1



La présente invention est relative à l'obtention d'ARNs interférents capables d'inhiber la réplication de morbillivirus, et à leur utilisation pour la prophylaxie ou la thérapie d'infections à morbillivirus, notamment pour l'obtention de vaccins.

Le genre des *Morbillivirus* appartient à la famille des *Paramyxoviridae* (Ordre des Mononegavirales) et regroupe notamment le PPRV (virus de la peste des petits ruminants), le RPV (Rinderpest virus ou virus de la peste bovine), le MV (ou MeV) (Measles virus ou virus de la rougeole), le CDV (canine distemper virus ou virus de la maladie de Carré), le DMV (dolphin morbillivirus ou morbillivirus du dauphin) et le PDV (phocine distemper virus ou virus du phoque veau marin).

Le génome des morbillivirus est constitué d'un ARN monocaténaire non segmenté, de polarité négative. Sa structure est schématisée sur la Figure 1. Cet ARN monocaténaire comprend 6 gènes : *N*, *P*, *M*, *F*, *H* et *L*.

Les produits des gènes *N* (Nucléoprotéine), *P* (Phosphoprotéine) et *L* (protéine Large ; ARN polymérase ARN dépendante) s'associent avec l'ARN génomique viral pour former la nucléocapside, qui protège le génome viral, et constitue un complexe polymérasique permettant la réplication et la transcription du virus.

Les produits des gènes *F* (protéine de Fusion) et *H* (Hémagglutinine) font partie de l'enveloppe virale. La glycoprotéine *H* permet l'attachement du virus à la cellule cible, et la glycoprotéine *F* intervient dans la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire.

Le produit du gène *M* (protéine de Matrice) assure l'interface entre la nucléocapside et l'enveloppe virale.

L'interférence ARN est un mécanisme biologique conservé au cours de l'évolution, qui induit l'extinction spécifique de gènes par dégradation spécifique des ARNs messagers et/ou arrêt de leur traduction. Elle a été observée initialement chez *Caenorhabditis elegans* : l'injection chez ce nématode d'ARN double-brin inhibe l'expression du gène qui contient la séquence de la molécule

injectée. Il a ensuite été montré (FIRE et al., Nature, 391, 806, 1998) que c'était l'ARN double-brin qui était à l'origine de ce mécanisme. Dans la cellule, cet ARN double-brin est rapidement segmenté par une endonucléase de type ARNase III, appelée DICER, en petits ARN de 21 à 28 nucléotides : les « small interfering ARN » siARN (ZAMORE et al., Cell, 101, 25, 2000). Les siARNs sont incorporés dans un complexe enzymatique nommé RISC pour « RNA-Induced Silencing Complex ». Le complexe RISC dissocie les brins des siARNs, et guide l'appariement des brins antisens avec leurs séquences-cibles complémentaires. Les ARNs messagers contenant ces séquences-cibles sont alors clivés au niveau du duplex ainsi formé ou leur traduction par les ribosomes est bloquée.

Chez les mammifères, la présence d'ARN double-brin de taille supérieure à 30pb dans une cellule induit également une réponse médiée par l'interféron, qui se traduit par une dégradation des ARN messagers, non spécifique de séquence. Il a été montré (ELBASHIR et al., Nature, 411, 494, 2001) que l'utilisation de siARNs dans des cellules de mammifères n'induisait pas cette réponse de type interféron, et permettait d'inhiber spécifiquement l'expression des gènes contenant les séquences complémentaires de ces siARNs.

L'interférence ARN a été largement utilisée vis-à-vis de virus de diverses familles, pour cibler différents gènes dans le but d'étudier leur fonction, et/ou à des fins de thérapie anti-virale.

En ce qui concerne les virus à ARN monocaténaire négatif non segmenté, les premières expérimentations ont été effectuées chez un pneumovirus, le virus respiratoire syncytial (RSV) (BITKO & BARIK, BMC Microbiol, 1, 34, 2001). Un siARN ciblant le gène de la protéine P (sous-unité de l'ARN polymérase ARN dépendante), a permis d'obtenir une réduction de 90% de l'expression de cette protéine, s'accompagnant d'une diminution drastique de l'expression de l'ensemble des protéines virales, et d'une réduction du titre viral ; un siARN ciblant le gène de la protéine F induit une réduction spécifique de la synthèse de cette

protéine, sans affecter celle des autres protéines virales, et inhibe la formation de syncytia.

La Demande PCT WO2005/056021 décrit l'utilisation d'un siARN pour cibler et inactiver le gène
5 codant pour une protéine non-structurale du RSV, la protéine NS1, et augmenter ainsi la réponse interféron vis-à-vis du RSV.

Une publication récente de S. BARIK (BARIK, Virus Res, 102, 27, 2004) passe en revue les différentes
10 approches utilisées pour contrôler la réplication de virus à ARN monocaténaire négatif non segmenté à l'aide de siARN. Le ciblage des gènes codant les protéines P ou L, qui constituent des sous-unités essentielles du complexe polymérasique viral, conduit à une disparition quasi-totale
15 de la synthèse de l'ARN viral ; le ciblage de gènes non essentiels à la synthèse de l'ARN viral, mais impliqués dans les interactions du virus avec la cellule-hôte produit des résultats plus variables.

L'interférence ARN représente potentiellement un
20 outil particulièrement intéressant pour la prophylaxie et/ou le traitement des infections virales.

Cependant, malgré tout l'intérêt théorique de cette approche, sa mise en pratique pour obtenir une activité antivirale efficace pose différents problèmes,
25 concernant notamment le choix des séquences-cibles utilisées dans les siARNs.

On utilise ici le terme de « gène-cible » pour désigner un gène dont on cherche à obtenir l'extinction, et celui de « séquence-cible », pour désigner une portion de
30 l'ARNm d'un gène-cible reconnue par un siARN particulier.

L'un des problèmes relatifs au choix de séquences-cibles découle de la fréquence des mutations, qui est généralement très élevée chez les virus. Une mutation intervenant dans la séquence-cible d'un siARN peut permettre
35 au virus mutant d'échapper à la reconnaissance. Il est donc souhaitable de choisir une séquence-cible conservée entre différents virus, où des mutations sont moins susceptibles d'apparaître.

D'autre part, même s'il est relativement aisé, pour un gène cible donné, de définir des siARNs permettant d'obtenir une certaine atténuation de l'expression de ce gène, il est beaucoup plus problématique d'obtenir des
5 siARNs permettant de parvenir à un niveau d'extinction du gène-cible suffisant pour inhiber la réplication virale.

Il est en effet connu que l'efficacité de l'interférence ARN peut varier considérablement d'un siARN à l'autre. De très nombreux facteurs apparaissent impliqués
10 dans cette variabilité, relatifs notamment à la séquence-cible elle-même (par exemple la teneur en G/C, la présence de certaines bases à certaines positions), à la position de cette séquence-cible dans le gène ciblé, et à la présence de structures secondaires de l'ARNm pouvant diminuer
15 l'accessibilité de la séquence-cible pour le siARN. Différentes méthodes ont été proposées pour tenter de prédire l'efficacité des siARNs (GILMORE et al., J Drug Target, 12, 315, 2004 ; UI-TEI & SAIGO, Tanpakushitsu Kakusan Koso, 49, 2662, 2004 ; AMARZGUIOUI & PRYDZ, Biochem
20 Biophys Res Commun, 316, 1050, 2004 ; HEALE et al., Nucleic Acids Res, 33, e30, 2005 ; REYNOLDS et al., Nat Biotechnol, 22, 326, 2004 ; ARZIMAN et al., Nucleic Acids Res, 33, W582, 2005 ; HUESKEN et al., Nat Biotechnol, 23, 995, 2005).

Cependant, malgré les progrès effectués dans la
25 rationalisation des critères de choix des séquences-cibles optimales, ce choix demeure en grande partie empirique, et ses résultats aléatoires.

Les Inventeurs ont émis l'hypothèse que l'extinction du gène codant pour la protéine N des morbillivirus pourrait permettre d'obtenir l'inhibition de
30 la réplication virale, et ont entrepris de rechercher si cette extinction pouvait être obtenue à l'aide de siARNs ciblant des régions de ce gène conservées entre les morbillivirus.

Ils sont parvenus à définir, dans l'une de ces
35 régions conservées, un locus contenant une séquence-cible permettant de définir des siARNs capables d'inhiber l'expression de la protéine N, cette inhibition induisant une inhibition de la réplication des morbillivirus.

Au sens de la présente invention, on entend par inhibition de l'expression d'un gène, une diminution d'au moins 85%, de préférence au moins 90% du niveau d'expression d'un gène par rapport à son niveau normal. On entend par inhibition de la réplication virale, une diminution d'au moins 95%, de préférence au moins 98% de la quantité de virus par rapport à celle produite dans des conditions normales de réplication.

La présente invention a en conséquence pour objet un procédé pour inhiber la réplication d'un morbillivirus, caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition du gène *N* d'un morbillivirus, à l'aide d'un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant le motif défini par la séquence générale suivante :

RRWYNNRHUGGUUHGARA (SEQ ID NO: 1)

dans laquelle :

A = Adénine

C = Cytosine

G = Guanine

U = Uracile

R = A ou G

Y = C ou U

W = A ou U

H = A ou C ou U

N = A ou C ou G ou U.

La séquence générale SEQ ID NO: 1 a été établie à partir de l'alignement des séquences des gènes *N* des morbillivirus PPRV, RPV, MV, CDV, DMV, et PDV, représenté sur la Figure 2.

La présente invention a également pour objet des ARNs interférents utilisables pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, à savoir des ARNs interférents dirigés contre la région du gène *N* d'un morbillivirus contenant le motif défini par la séquence générale SEQ ID NO: 1.

Par exemple, pour inhiber l'expression du gène *N* du virus de la rougeole, on choisira un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GGUUCGGAUGGUUCGAGA (SEQ ID NO: 2) ; pour inhiber

l'expression du gène *N* du RPV, on choisira un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : AGUCUUACUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 3) ; pour inhiber l'expression du gène *N* du PPRV, on choisira un

5 ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GGAUCAACUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 4) ; pour inhiber l'expression du gène *N* du CDV, on choisira un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante :

10 AAUUAGGCUGGUUAGAGA (SEQ ID NO: 5) ; pour inhiber l'expression du gène *N* du PDV, on choisira un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : AAAUGGGCUGGUUAGAAA (SEQ ID NO: 6) ; pour inhiber l'expression du gène *N* du DMV, on choisira un

15 ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GAACCCAUUGGUUUGAGA (SEQ ID NO : 7).

Typiquement, un ARN interférent conforme à l'invention comprend une portion de 19 à 29 pb, de

20 préférence de 19 à 23 pb, d'une séquence antisens du gène *N* d'un morbillivirus, ladite portion contenant un motif défini par la séquence générale UYUCDAACCADYNNRWYY (SEQ ID NO: 8), dans laquelle A, C, G, U, R, Y, W, et N sont tels que définis ci-dessus et D = G, A ou U.

25 La séquence SEQ ID NO: 8 représente la séquence antisens de la séquence-cible SEQ ID NO: 1 définie ci-dessus.

Par exemple, dans le cas du virus de la rougeole, un ARN interférent conforme à l'invention contient

30 au moins la séquence suivante : UCUCGAACCAUCCGAACC (SEQ ID NO: 9) ; dans le cas du RPV, un ARN interférent conforme à l'invention contient au moins la séquence suivante : UCUCAAACCAGUAAGACU (SEQ ID NO: 10) ; dans le cas du PPRV, un ARN interférent conforme à l'invention contient

35 au moins la séquence suivante : UCUCAAACCAGUUGAUCC (SEQ ID NO: 11) ; dans le cas du CDV, un ARN interférent conforme à l'invention contient au moins la séquence suivante : UCUCUAACCAGCCUAAUU (SEQ ID NO: 12) ; dans le cas du PDV, un ARN interférent conforme à l'invention contient

au moins la séquence suivante : UUUCUAACCAGCCCAUUU (SEQ ID NO: 13) ; dans le cas du DMV, un ARN interférent conforme à l'invention contient au moins la séquence suivante : UCUCAAACCAAUGGGUUC (SEQ ID NO : 14).

5 Le cas échéant, un ARN interférent conforme à l'invention peut être utilisé en combinaison avec un ou plusieurs autres ARN interférents ciblant d'autres régions du génome de morbillivirus, et notamment d'autres régions du gène N.

10 Dans ce cadre, on peut notamment utiliser, en combinaison avec un ARN interférent conforme à l'invention :

- un ARN interférent dirigé contre une région de l'ARNm du gène N contenant un motif défini par la séquence générale suivante : GSMGRUUYAUGGUVKCDYU (SEQ ID NO : 15), dans
15 laquelle A, C, G, U, R, Y, et D sont tels que définis ci dessus et M = A ou C, K = G ou U, S = G ou C, V = G, A ou C, et/ou

- un ARN interférent dirigé contre une région de l'ARNm du gène N contenant un motif défini par la séquence générale
20 suivante : GCHYUDGGNYUDCAYGARU (SEQ ID NO : 16) dans laquelle A, C, G, U, R, Y, D, H, et N sont tels que définis ci-dessus.

Les séquences générales SEQ ID NO: 15 et SEQ ID NO: 16 ont été établies à partir de l'alignement des
25 séquences des gènes N des morbillivirus PPRV, RPV, MV, CDV, DMV, et PDV, représenté sur la Figure 2.

Par exemple :

- pour inhiber l'expression du gène N du virus de la rougeole, on peut utiliser, en combinaison avec un ARN
30 interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence GGUUCGGAUGGUUCGAGA (SEQ ID NO: 2), un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCCGAUUCAUGGUCGCUCU (SEQ ID NO: 17) et/ou un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit
35 gène contenant la séquence suivante : GCUCUUGGACUGCAUGAAU (SEQ ID NO : 18);

- pour inhiber l'expression du gène N du RPV, on peut utiliser, en combinaison avec un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence

AGUCUUACUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 3) un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCAGAUUUAUGGUGGCAUU (SEQ ID NO: 19) et/ou un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCACUGGGCCUGCAUGAAU (SEQ ID NO : 20) ;

- pour inhiber l'expression du gène N du PPRV, on peut utiliser, en combinaison avec un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence GGAUCAACUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 4) un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GGCGGUUCAUGGUAUCUCU (SEQ ID NO: 21) et/ou un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCAUUAGGCCUUCACGAGU (SEQ ID NO : 22);

- pour inhiber l'expression du gène N du CDV, on peut utiliser, en combinaison avec un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence AAUUAGGCUGGUUAGAGA (SEQ ID NO: 5) un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GGCGAUUCAUGGUGGCGCU (SEQ ID NO: 23) et/ou un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCUCUUGGGUUGCAUGAGU (SEQ ID NO : 24) ;

- pour inhiber l'expression du gène N du PDV, on peut utiliser, en combinaison avec un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence AAAUGGGCUGGUUAGAAA (SEQ ID NO: 6) un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GGCGAUUUAUGGUGGCAUU (SEQ ID NO: 25) et/ou un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCACUUGGUCUACAUGAGU (SEQ ID NO : 26) ;

- pour inhiber l'expression du gène N du DMV, on peut utiliser, en combinaison avec un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence GAACCCAUUGGUUUGAGA (SEQ ID NO : 7) un ARN interférent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GGAGAUUCAUGGUGGCAUU (SEQ ID NO : 27) et/ou un ARN

interfèrent ciblant la région de l'ARNm dudit gène contenant la séquence suivante : GCCUUAGGGUUGCAUGAAU (SEQ ID NO : 28).

Un ARN interférent dirigé contre une région de l'ARNm du gène *N* contenant un motif défini par la séquence
5 SEQ ID NO : 15 comprend une portion de 19 à 29 pb, de préférence de 19 à 23 pb, d'une séquence antisens du gène *N* d'un morbillivirus, ladite portion contenant la séquence générale ARHGMBAACCAURAAAYCKSC (SEQ ID NO: 29), dans laquelle A, C, G, U, R, Y, M, H, K et S sont tels que définis ci-dessus, et B = G, U ou C.

Un ARN interférent dirigé contre une région de l'ARNm du gène *N* contenant un motif défini par la séquence
15 SEQ ID NO : 16 comprend une portion de 19 à 29 pb, de préférence de 19 à 23 pb, d'une séquence antisens du gène *N* d'un morbillivirus, ladite portion contenant la séquence générale AYUCRUGHARNCCCHARDGC (SEQ ID NO: 30), dans laquelle A, C, G, U, R, Y, H, et N sont tels que définis ci-dessus.

Les séquences SEQ ID NO: 29 et SEQ ID NO : 30 représentent respectivement les séquences antisens des
20 séquence-cible SEQ ID NO: 15 et SEQ ID NO : 16 définies ci-dessus.

Par exemple, dans le cas du virus de la rougeole, un ARN interférent conforme à l'invention contenant au moins la séquence UCUCGAACCAUCCGAACC
25 (SEQ ID NO: 9) peut être utilisé en combinaison avec un ARN interférent contenant au moins la séquence suivante : AGAGCGACCAUGAAUCGGC (SEQ ID NO: 31) et/ou avec un ARN interférent contenant au moins la séquence suivante : AUUCAUGCAGUCCAAGAGC (SEQ ID NO : 32); dans le cas du RPV, un
30 ARN interférent conforme à l'invention contenant au moins la séquence UCUCAAACCAGUAAGACU (SEQ ID NO: 10) peut être utilisé en combinaison avec un ARN interférent contenant au moins la séquence suivante : AAUGCCACCAUAAAUCUGC (SEQ ID NO: 33) et/ou avec un ARN interférent contenant au moins la
35 séquence suivante : AUUCAUGCAGGCCAGUGC (SEQ ID NO : 34) ; dans le cas du PPRV, un ARN interférent conforme à l'invention contenant au moins la séquence UCUCAAACCAGUUGAUCC (SEQ ID NO: 11) peut être utilisé en combinaison avec un ARN interférent contenant au moins la

séquence suivante : AGAGAUACCAUGAACCGCC (SEQ ID NO: 35)
et/ou avec un ARN interférent contenant au moins la séquence
suivante : ACUCGUGAAGGCCUAAUGC (SEQ ID NO : 36) ; dans le
cas du CDV, un ARN interférent conforme à l'invention
5 contenant au moins la séquence UCUCUAACCAGCCUAAUU
(SEQ ID NO: 12) peut être utilisé en combinaison avec un ARN
interférent contenant au moins la séquence suivante :
AGCGCCACCAUGAAUCGCC (SEQ ID NO: 37) et/ou avec un ARN
interférent contenant au moins la séquence suivante :
10 ACUCAUGCAACCCAAGAGC (SEQ ID NO : 38) ; dans le cas du PDV,
un ARN interférent conforme à l'invention contenant au moins
la séquence UUUCUAACCAGCCCAUUU (SEQ ID NO: 13) peut être
utilisé en combinaison avec un ARN interférent contenant au
moins la séquence suivante : AAUGCCACCAUAAAUCGCC (SEQ ID NO:
15 39) et/ou avec un ARN interférent contenant au moins la
séquence suivante : ACUCAUGUAGACCAAGUGC (SEQ ID NO : 40) ;
dans le cas du DMV, un ARN interférent conforme à
l'invention contenant au moins la séquence
UCUCAACCAAUGGGUUC (SEQ ID NO : 14) peut être utilisé en
20 combinaison avec un ARN interférent contenant au moins la
séquence suivante : AAUGCCACCAUGAAUCUCC (SEQ ID NO: 41)
et/ou avec un ARN interférent contenant au moins la séquence
suivante : AUUCAUGCAACCCUAAGGC (SEQ ID NO : 42).

Les différents ARNs interférents définis ci-
25 dessus peuvent se présenter sous diverses formes.

Il peut s'agir d'un ARN antisens simple-brin,
capable de s'intégrer dans le complexe RISC, et de
s'apparier avec la séquence cible, induisant son clivage
(TIJSTERMAN et al., Science, 295, 694, 2002 ; MARTINEZ et
30 al., Cell, 110, 563, 2002 ; BARIK, Virus Res, 102, 27,
2004).

Cependant il s'agira de préférence d'un ARN
contenant à la fois la séquence-cible et la séquence
antisens correspondante, sous forme de siARN, ou le cas
35 échéant de sh(« short hairpin »)ARNs (YU et al., Proc Natl
Acad Sci U S A, 99, 6047, 2002 ; PADDISON et al., Genes Dev,
16, 948, 2002 ; SIOLAS et al., Nat Biotechnol, 23, 227,
2005), qui est transformé dans la cellule en siARN.

Les siARNs ont généralement une longueur de 21 à 25 nucléotides ; ils contiennent une portion double-brin, généralement de 19 à 21 nucléotides, constituée de la séquence cible et de la séquence antisens correspondante ; l'un ou l'autre brin, ou les deux, comporte(nt) généralement à l'extrémité 3' une extension simple-brin de 2 ou 3 nucléotides ; le plus souvent (mais non obligatoirement), il s'agit d'un dinucléotide, de séquence TT.

Les shARNs sont constitués d'un seul brin, d'une longueur de 50 à 70 nucléotides, qui peut se replier pour former une structure en épingle à cheveux, contenant une portion double-brin d'une longueur de 19 à 29 nucléotides, constituée par la séquence cible et la séquence antisens correspondante, et une boucle de 5 à 10 nucléotides. Ils peuvent comprendre également, à l'extrémité 3', une extension simple-brin de 2 ou 3 nucléotides.

Les ARN interférents peuvent être aussi utilisés sous forme de précurseurs de microARNs (pre-miARN). Les microARNs (miARN) sont des ARNs d'environ 22 nucléotides, constitués d'un seul brin et qui se fixent sur l'extrémité 3' non codante de l'ARNm, ce qui a pour effet de réprimer l'expression de cet ARNm sans le dégrader (contrairement aux siARNs ou shARNs). Les miARNs sont des molécules importantes pour la régulation « naturelle » de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. Les miARNs sont produits dans le cytoplasme des cellules à partir de précurseurs nucléaires d'environ 70 nucléotides en forme d'épingle à cheveux, appelés pre-miARNs, clivés en miARNs par le complexe DICER. La séquence d'un pre-miARN, identifié dans les conditions naturelles dans une cellule eucaryote, peut être modifiée pour y introduire une séquence siARN, qui, libérée par le DICER ira alors dégrader un autre ARNm. Ce pre-miARN modifié sert alors de « véhicule » pour le siARN d'intérêt, ce qui a pour résultat d'augmenter l'efficacité de l'interférence. La possibilité d'utiliser des pre-miARNs modifiés pour inhiber la réplication virale a été démontrée par BODEN et al. (Nucleic Acids Res., 13, 1154, 2004) pour HIV-1. Dans ce cas, l'efficacité de l'interférence peut être supérieure de 80% à celle conférée par le siARN équivalent.

Ces ARNs interférents peuvent être obtenus par des méthodes classiques de préparation des acides nucléiques (pour revue cf. par exemple AMARZGUIOUI et al., FEBS Lett, 579, 5974, 2005).

5 Ils peuvent ainsi être préparés par exemple par synthèse chimique, ou bien par génie génétique. Dans ce dernier cas on utilisera un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN pouvant être transcrite en un ARN interférent conforme à l'invention, placée sous contrôle
10 d'un promoteur approprié. Généralement, ledit promoteur est un promoteur viral, par exemple le promoteur T3, T7, SP6, pCMV ou un promoteur reconnu par la polymérase III, par exemple le promoteur du petit ARN *U6*, ou celui de l'ARN *H1* (MIYAGISHI & TAIRA, Nucleic Acids Res Suppl, 113, 2002) ;
15 des promoteurs reconnus par la polymérase II sont toutefois également utilisables.

Les vecteurs d'expression définis ci-dessus font également partie de l'objet de la présente invention.

De très nombreuses méthodes pour introduire des
20 ARNs interférents dans des cellules ou des organismes dans lesquelles on souhaite obtenir l'extinction de l'expression d'un gène-cible sont connues en elles-mêmes.

Dans le cas où l'on souhaite obtenir une extinction temporaire de l'expression du gène-cible, on peut
25 administrer directement l'ARN interférent, préférablement associé à un véhicule approprié, permettant de faciliter son entrée dans la cellule et/ou de le protéger de la dégradation. A titre d'exemples de véhicules utilisables, on citera notamment des liposomes ou des nanoparticules.

30 Pour obtenir une extinction à plus long terme de l'expression du gène-cible, notamment dans le cas des cellules de mammifères, on utilise un vecteur permettant d'exprimer l'ARN interférent dans la cellule. De très nombreux vecteurs utilisables dans ce but sont connus en
35 eux-mêmes. On citera notamment des vecteurs dérivés de rétrovirus, de lentivirus, ou d'adénovirus (BARTON & MEDZHITOV, Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 14943, 2002 ; TISCORNIA et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100, 1844, 2003;

XIA et al., Nat Biotechnol, 20, 1006, 2002 ; SHEN et al., FEBS Lett, 539, 111, 2003).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ARN interférent ou d'un vecteur d'expression conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une infection à morbillivirus, et notamment au traitement ou à la prévention de la rougeole, de la peste bovine, de la peste des petits ruminants, de la maladie de Carré, de la peste des phoques ou d'une infection au DMV.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ARN interférent ou un vecteur d'expression conforme à l'invention. Avantageusement, ladite composition pharmaceutique est un vaccin.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples illustrant l'obtention d'un ARN interférent conforme à l'invention, et son utilisation pour bloquer la réplication des morbillivirus PPRV et RPV.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du génome des morbillivirus.

Figure 2 : Alignement multiple des séquences d'ADNc du gène N de différents morbillivirus, PPRV (X74443), RPV (X98291), MV (Z66517), CDV (NC001921), DMV (AJ608288) et PDV (X75717) par le logiciel Vector NTI (Informax Inc). Les nucléotides identiques à ceux de la séquence consensus indiquée en bas de l'alignement sont représentés par un point ; les nucléotides qui diffèrent de la séquence consensus sont indiqués. Les régions encadrées, où tous les nucléotides sont indiqués, représentent les séquences-cibles des siARNs NRp1 et 2 sur la séquence de RPV, et des siARNs NPPR1 et 3 et des siARNs NPPR5 à 10 sur la séquence de PPRV. Les codons « start » et « stop » sont en caractères gras et soulignés.

Figure 3 : Effet des siARNs sur l'effet cytopathique (ECP) induit par le virus de la peste des petits ruminants sur des cellules VERO. Ordonnées : échelle de pourcentages

d'inhibition de l'ECP. Abscisses : concentration des siARNs en nM.

--◆-- : siARN NPPR1 ; — □ — : siARN NPPR2 ; —▲— : siARN NPPR3 ; —▲— siARN NPPR10 ; —■— : siARN GAPDH ; —●— :
 5 cellules non-infectées; --■-- : cellules infectées non transfectées.

Figure 4 : Effet des siARNs sur l'expression de la protéine N du virus PPRV dans les cellules VERO. (a) Abscisses : fluorescence liée à l'expression de la protéine N ;
 10 Ordonnées : nombre de cellules fluorescentes ; siARN1 : siARN NPPR1 ; siARN2 : siARN NPPR2 ; cellules non infectées : contrôle négatif ; cellules infectées : contrôle positif. (b) Abscisses : concentration (en nM) des siARNs. Ordonnées : pourcentage de cellules fluorescentes ;
 15 □ : siARN NPPR1 ; ■ : siARN GAPDH.

Figure 5 : effet des siARNs NPPR1, 2 et 3 sur la synthèse d'ARN viraux mesurée par RT-PCR quantitative en temps réel (QRT-PCR). Représentation de deux essais indépendants.

Figure 6 : effet des siARNs NPPR1 (hachures verticales),
 20 NPPR2 (blanc), NPPR3 (grisé), NPPR10 (noir) et GAPDH (hachures diagonales) sur la réplication virale mesurée par le titre viral dans les tapis cellulaires infectés.

EXEMPLES : MATERIEL ET METHODES

1) Virus et séquences d'intérêt

25 Le virus PPRV utilisé est la souche Nigeria 75/1 (DIALLO et al. Rev Elev Med Vet Pays Trop 42, 311, 1989), atténuée par passages en série sur cellules (SK/1, BK/1 et Vero/55). Il s'agit d'une souche vaccinale. La séquence complète du génome de cette souche est disponible sur
 30 Genbank (numéro d'accension X74443)

Le virus RPV utilisé est la souche RBOK (PLOWRIGHT et FERRIS, Res. Vet. Sci, 3, 172, 1962), souche vaccinale à virus atténué par passages en série sur cellules (BK/98 et Vero/2). La séquence complète du génome de cette
 35 souche est disponible sur Genbank (numéro d'accension Z30697)

Les virus PPRV et RPV sont multipliés sur cellules VERO (ATCC) entretenues en monocouche en présence

de milieu complet soit, milieu essentiel de Eagle MEM avec sels de Earle (Eurobio, Courtaboeuf, France), 10% de sérum de fœtus de bovin (Eurobio, Courtaboeuf, France) et 2 mM de L-glutamine (Gibco, Mife Technologies, UK).

5 **2) Culture cellulaire, transfection et infection virale**

Des cellules VERO adhérentes sont décollées à l'aide d'une solution contenant de la trypsine et de l'EDTA (Sigma-Aldrich, Lyon, France) puis resuspendues dans du milieu MEM (Minimum Eagle Medium) complet à raison de 10⁵ cellules/ ml et distribuées dans des puits de plaque 24 puits. Les plaques sont incubées à 37°C et 5% CO₂. Par la suite, toutes les incubations de cellules ont lieu à 37°C en présence de 5% de CO₂. Lorsque le tapis cellulaire atteint 70-80% de confluence, le milieu est éliminé, puis les cellules sont incubées 30 minutes dans du milieu MEM dépourvu de sérum de fœtus de bovin.

Pour la transfection, le milieu est éliminé et remplacé par de la LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen) à raison de 500 ng dans 200 µl de milieu de transfection OPTI-MEM I® (Invitrogen) contenant les siRNA à différentes concentrations (de 6,5 à 100 nM final dans le mélange de transfection). L'incubation suivante a lieu pendant trois heures.

Pour l'infection virale, le milieu de transfection est éliminé et remplacé par du MEM et 5% de sérum de fœtus de bovin. Les cellules sont incubées 24 heures puis infectées avec le virus PPRV ou RPV à une multiplicité d'infection de 0,1 dose cytopathique 50% par cellule, en milieu sans sérum de fœtus de bovin, la dose cytopathique 50% étant la quantité de virus induisant un ECP sur 50% des tapis cellulaires infectés. Après une heure de contact, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du milieu MEM, puis du milieu MEM avec 5% de sérum de fœtus de bovin est ajouté sur les cellules. Les cellules sont observées quotidiennement et l'évolution de l'effet cytopathique (ECP) dû au virus est évaluée selon une grille de pourcentages (échelle allant de 0%, pas d'ECP à 100%, ECP maximal). L'effet des siARN est exprimé en pourcentage d'inhibition de l'ECP.

Quatre à cinq jours après infection, le surnageant de culture cellulaire d'une part, et les cellules d'autre part sont recueillis pour analyse en titrage viral et en expression d'antigènes viraux par cytométrie en flux. Des
5 contrôles consistant en des cellules non transfectées et non infectées et des cellules infectées et non transfectées sont inclus dans chaque série de tests des siARNs.

4) Titrage viral

Les surnageants de culture cellulaire ou les
10 cellules elles-mêmes sont conservés à -70°C jusqu'à utilisation pour titrage. Le titrage viral est effectué sur culture cellulaire (VERO) à partir d'une série de dilutions de raison 10 de la suspension virale à titrer. Le titre est déterminé selon la méthode de REED et MUENCH (Am J Trop Med
15 Hyg, 127, 493, 1938) et exprimé en dose cytopathique 50 (DCP₅₀) par ml.

5) Mesure de l'expression d'antigènes viraux

L'expression des protéines de nucleocapside (N) et de matrice (M) virales a été mesurée par cytométrie en
20 flux en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques : anticorps 38-4 spécifique de la protéine N du PPRV ; anticorps IVB2-4 spécifique de la protéine N du RPV ; anticorps 19-6 spécifique de la protéine M du PPRV et de la protéine M du RPV (LIBEAU et al., Revue d'Elevage et de
25 Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 50, 181-190, 1997), et anticorps 11/295/33 spécifique de la molécule CD8 lymphocytaire de porc (SAALMULLER et al., Vet Immunol Immunopathol, 43, 249, 1994) utilisé comme contrôle isotypique de spécificité du marquage.

30 Les cellules adhérentes sont décollées du plastique par incubation avec une solution contenant de la trypsine et de l'EDTA pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées dans du tampon phosphate PBS, 0,1% d'azide de sodium, 5% de sérum de cheval et 0,0062% de saponine
35 (poids/volume). Elles sont dénombrées et distribuées à raison de 10⁶ de cellules par puits d'une plaque 96 puits. Tous les marquages sont effectués en plaque. Après sédimentation des cellules par centrifugation et élimination

du surnageant, 100 µl d'une dilution appropriée de l'anticorps monoclonal anti-N, anti-M ou isotypique sont ajoutés et les cellules re-suspendues par agitation mécanique. Les cellules sont incubées 30 minutes à +4°C. Elles sont ensuite lavées deux fois dans le même tampon phosphate, puis incubées 30 minutes à +4°C, dans 50 µl d'une dilution appropriée d'un anticorps anti-anticorps de souris, conjugué à la fluorescéine (BIORAD, France). Les cellules sont lavées deux fois puis fixées 15 minutes à température ambiante avec 100 µl d'une solution de paraformaldéhyde. Les cellules sont resuspendues dans 400 µl de PBS FACS FLOW (Becton Dickinson, USA). L'analyse des cellules s'effectue au FACsort (Becton Dickinson, USA). Les débris cellulaires sont éliminés de l'analyse au FACS par un fenêtrage placé sur FSCxSSC (FSC : Forward SCatter ; SSC : Side SCatter), puis la fluorescence est mesurée sur 20 000 cellules.

6) Mesure quantitative de la synthèse des ARN viraux

Les cellules et le surnageant de culture sont récoltés 96 heures après infection et congelés à -70°C. L'ARN total est extrait à partir de 100 µl de cette suspension cellulaire mélangés à la solution de lyse du kit RNeasy, selon les instructions du fabricant (Qiagen, Courtaboeuf, France). La suite du protocole correspond au manuel d'instruction du fabricant. L'ARN extrait est conservé à -70°C. L'ARN est quantifié par QRT-PCR en une étape (Brilliant SYBR Green QRT-PCR Master Mix, 1 step, Stratagene). Les amorces utilisées sont NP3bis = 5'-GTCTCGGAAATCGCCTCACAG-3' (sens) (SEQ ID NO : 43) et NP4bis = 5'-CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAA-3' (antisens) (SEQ ID NO : 44). Ces amorces ont été dérivées des amorces précédemment décrites (COUACY-HYMANN et al., J Virol Methods, 100, 17, 2002) par addition d'un G en 5' de NP3bis et délétion de quatre bases en 3' et délétion de trois bases en 3' de NP4bis. Ces amorces amplifient un fragment de 351 bases. Une solution réactionnelle principale constituée de 12,5 µl SYBR Green Master mix (2x), 2,5 µl de 1 µM de chaque amorce, 0,0625 µl de Stratascript Reverse Transcriptase RT et 2,4375 µl d'eau est déposée dans un microtube, puis 5 µl de l'ARN

extrait sont ajoutés. La QRT-PCR est mise en œuvre sur un appareil Mx3000P (Stratagene, Amsterdam, NL) selon le protocole suivant :

- transcription inverse à 50°C pendant 30 minutes
- 5 - dénaturation à 95°C pendant 10 minutes
- amplification avec 35 cycles [95°C, 30 secondes ; 55°C, 1 minute ; 72°C, 30 secondes]
- dissociation avec un cycle [95°C, 1 minute ; 55°C, 30 secondes ; 95°C, 30 secondes]

10 L'étalon standard pour la quantification est constitué du gène de la protéine N du PPRV inséré dans un plasmide pBluescript KS+ (COUACY-HYMANN et al., 2002, précité). Pour la quantification, le plasmide est linéarisé, purifié par précipitation à l'alcool et dilué de façon
15 sérielle de 10 en 10. La quantité d'ARN détectée dans les échantillons soumis à analyse est ramenée au nombre de copies de gène N incorporées dans la série de dilutions de l'étalon standard.

EXEMPLE 1 : SELECTION ET SYNTHESE DE siARNs

20 Les zones conservées du gène N ont été localisées par un alignement multiple des séquences correspondantes issues de différents morbillivirus à l'aide d'un logiciel d'analyse de séquences (Vector NTI package, Informax Inc). Cet alignement multiple de séquences a été
25 effectué sur les séquences des gènes N des morbillivirus PPRV (souche vaccinale Nigéria 75/1; GenBank X74443), RPV (GenBank Z30697), MV (GenBank Z66517), CDV (GenBank NC_001921), DMV (GenBank AJ608288) et PDV (GenBank X75717).

30 Dans les régions présentant le plus fort degré d'homologie, 7 séquences-cibles ont été définies pour le virus PPRV.

 Les siARNs dérivés du gène N du virus PPRV, et contenant des séquences identiques aux séquences-cibles définies dans ce gène, sont dénommés NPPR1, et NPPR5 à 10 ;
35 un siARN dénommé NPPR2, ne présentant au mieux que 58% d'identité avec la séquence du gène N du virus PPRV (en positions.256-274, 751-769, et 850-869 de la séquence d'ADNc), et un siARN dénommé NPPR3, dérivé de la même

séquence cible que le siARN NPPR10, mais présentant une différence d'une base avec ladite séquence-cible (C dans la séquence cible remplacé par G à l'extrémité 5' du brin sens du siRNA NPPR3) ont également été synthétisés.

5 Pour le virus RPV, 2 séquences cibles ont été définies au niveau du locus correspondant à la séquence-cible du siARN-NPPR1. Les siARNs correspondants sont dénommés NRP1 et NRP2.

10 Tous les siARNs mentionnés ci-dessus ont été synthétisés chimiquement par la société Ambion (Europe) (Cambridgeshire, UK).

15 Pour tester la spécificité de l'interférence, un siARN ciblant la séquence de la Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) a été utilisé : la séquence et le siARN sont disponibles chez Ambion (Europe) (Silencer™ GAPDH siARN (Human) Control 4605).

20 Toutes les séquences siARNs identifiées ont été soumises à une recherche d'homologie dans Genbank à l'aide du logiciel Blast. Le maximum d'identité observé entre le siARN-GAPDH et la séquence codant pour la protéine N du virus PPRV est de 72%.

25 Les séquences des brins sens et antisens des différents siARNs mentionnés ci-dessus, ainsi que leur position par rapport à la séquence du gène N et par rapport à la séquence du cadre de lecture dudit gène, sont indiquées dans le Tableau I ci-après.

Les positions des séquences cibles des siARNs NPPR1, NPPR3, NPPR5 à NPPR10, et NRP1 et NRP2 sont indiquées sur la Figure 2.

TABLEAU I

Nom du siARN	Séquence	Position dans l'ADNc / dans le cadre de lecture
siARN-NPPR1 sens : 5'-GGAUCAACUGGUUUGAGAAtt -3' (SEQ ID NO : 45) (position 480-498/428-446) antisens : 5'-UUCUCAAAACCAGUUGAUCCtt -3' (SEQ ID NO : 46)		
siARN-NPPR2 sens : 5'-GCUCACCUUCAUUCUUUUCtt -3' (SEQ ID NO:47) (seulement 63% d'homologie) antisens : 5'-GAAAAGAAUGAAGGUGAGCtc -3' (SEQ ID NO: 48)		
siARN-NPPR3 sens : 5'-GGCCAGUUUCAUUCUUACUtt -3' (SEQ ID NO : 49) (position 850-868/798-816) antisens : 5'-AGUAAGAAUGAAACUGGCCtc -3' (SEQ ID NO : 50)		
siARN-NPPR5 sens: 5'- GAGAACUCAAUUCAGAACAt -3'(SEQ ID NO:51) (position 1001-1019/949-968) antisens : 5'- UGUUCUGAAUUGAGUUCUCtt -3' (SEQ ID NO : 52)		
siARN-NPPR6 sens : 5'- GGCGGUUCAUGGUUAUCUCUtt -3' (SEQ ID NO: 53) (position 741-759/689-707) antisens : 5'- AGAGAUACCAUGAACCGCct -3' (SEQ ID NO : 54)		
siARN-NPPR7 sens : 5'- GCAUUAGGCCUUCACGAGUtt -3' (SEQ ID NO : 55) (position 869-917/847-865) antisens : 5'- ACUCGUGAAGGCCUAAUGCtt -3' (SEQ ID NO : 56)		
siARN-NPPR8 sens : 5'- GUAUCAACAGCUAGGAGAGtt -3' (SEQ ID NO : 57)(position 958-976/906-924) antisens : 5'- CUCUCCUAGCUGUUGAUACtt -3' (SEQ ID NO : 58)		
siARN-NPPR9 sens:5'-GAACUUUGGCAGGUCAUAUtt -3'(SEQ ID No:59)(position 1102-1120/1050-1068) antisens : 5'- AUAUGACCUGCCAAAGUUCtt -3' (SEQ ID NO : 60)		
siARN-NPPR10 sens : 5'- CGCCAGUUUCAUUCUUACUtt -3' (SEQ ID NO: 61) (position 850-868/798-816) antisens : 3'- AGUAAGAAUGAAACUGGCGtt -3' (SEQ ID NO: 62)		
siARN-NRP1 sens : 5'-GCAGUCUUACUGGUUUGAGtt -3' (SEQ ID NO: 63) (position 478-496/426-444) antisens : 5'-CUCAAACCAGUAAGACUGCtt -3' (SEQ ID NO : 64)		
siARN-NRP2 sens : 5'-CAGUCUUACUGGUUUGAGAt -3' (SEQ ID NO: 65) (position 479-497/427-445) antisens : 5'-UCUCAAAACCAGUAAGACUGtc -3' (SEQ ID NO: 66)		
siARN-GAPDH sens : 5'-AAGGUCAUCCAUGACAACUtt -3' (SEQ ID NO: 67) antisens : 5'-AGUUGUCAUGGAUGACCUUtt -3' (SEQ ID NO : 68)		

EXEMPLE 2 : EFFET DES siARNs NPPR1, 2, ET 3 ET DU siARN-GAPDH SUR L'EFFET CYTOPATHIQUE DU VIRUS DE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS.

5 Des cellules VERO ont été transfectées avec différentes doses des siARNs NPPR1, 2, et 3 ou du siARN-GAPDH, puis infectées par le PPRV, selon le protocole décrit dans la section « Matériel et Méthodes » ; l'effet cytopathique a été évalué 4 jours après infection, indépendamment par deux

10 personnes différentes.

La Figure 3 illustre les résultats observés :

Parmi les siARNs testés, le siARN NPPR1 est celui qui inhibe le plus l'ECP, quelle que soit la dose utilisée. A la dose de 100 nM, on observe une inhibition

complète de l'ECP. Le siARN NPPR3, dont la séquence varie d'un nucléotide par rapport à la séquence cible définie sur le virus (cf. Exemple 1) inhibe l'ECP de façon moins marquée que NPPR1. Le siARN NPPR10, qui dirigé contre la même
5 séquence-cible que le siARN NPPR3, mais qui, contrairement à ce dernier est parfaitement complémentaire de ladite séquence-cible, inhibe également l'ECP de façon moins marquée que NPPR1 (résultats non-montrés)

Comme attendu, le siARN-NPPR2 ainsi que le
10 siARN-GAPDH ne produisent aucune neutralisation de l'ECP.

EXEMPLE 3 : EFFET DES siARN SUR L'EXPRESSION DE LA PROTEINE N ET DE LA PROTEINE M DU PPRV ET DU RPV.

Des cellules VERO ont été transfectées avec différentes doses du siARN NPPR1, du siARN NPPR2 ou du siARN
15 GAPDH, puis infectées par le PPRV, comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes » ; 4 à 5 jours après infection, la production de la protéine N dans les cellules est mesurée par cytométrie en flux, comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ».

20 La figure 4 (a) illustre les résultats observés dans des cellules transfectées avec 100 nM du siARN NPPR1 ou du siARN NPPR2, ainsi que dans des cellules non-infectées et non transfectées, et dans des cellules non-transfectées et infectées, utilisées à titre de contrôle. On observe une
25 très forte inhibition de l'expression de la protéine N dans les cellules infectées transfectées avec le siARN NPPR1, alors que dans celles transfectées avec le siARN NPPR2, le profil d'expression de la protéine N est très similaire à celui observé avec les cellules infectées non-transfectées,
30 bien qu'une certaine diminution de l'expression soit observée.

La figure 4 (b) illustre les résultats observés dans des cellules transfectées avec différentes doses du siARN NPPR1 ou du siARN GAPDH. On observe une diminution
35 très significative du pourcentage de cellules exprimant la protéine N à partir de 12,5 nM de siARN NPPR1.

Dans une seconde série d'expérimentations, l'expression de la protéine N et de la protéine M a été mesurée :

- dans des cellules VERO transfectées avec la dose optimale pour chacun des siARNs testés, à savoir 100 nM pour les siARNs NPPR1, 2, 3, ou 5 à 9, ou 25 nM pour le siARN NPPR10, puis infectées avec PPRV ou avec RPV;

- dans des cellules VERO transfectées avec 100 nM de l'un des siARNs NRP1 ou NRP2, puis infectées avec PPRV ou avec RPV.

La mesure de l'expression de la protéine M permet de vérifier que l'inhibition de l'expression de la protéine N entraîne une inhibition des autres protéines virales, ce qui traduit un effet sur la réplication du génome viral.

Les résultats sont résumés par le Tableau II ci-après.

TABLEAU II

Nature du siARN (concentration optimale)	Inhibition de l'expression de la nucléoprotéine PPRV (en %)	Inhibition de l'expression de la protéine de matrice PPRV (en %)	Inhibition de l'expression de la nucléoprotéine RPV (en %)	Inhibition de l'expression de la protéine de matrice RPV (en %)
siARN-NPPR1 (100 nM)	90	89	0	0
siARN-NPPR2 (100 nM)	25	11	nt	nt
siARN-NPPR3 (100 nM)	40	30	nt	nt
siARN-NPPR5 (100 nM)	16	nt	nt	nt
siARN-NPPR6 (100 nM)	68	nt	nt	nt
siARN-NPPR7 (100 nM)	63	nt	nt	nt
siARN-NPPR8 (100 nM)	34	nt	nt	nt
siARN-NPPR9 (100 nM)	35	nt	nt	nt
siARN-NPPR10 (25 nM)	60	55	nt	nt
siARN-NRP1 (100 nM)	0	nt	35	31
siARN-NRP2 (100 nM)	0	nt	97	92,5
siARN-GAPDH (100 nM)	0	5	13	3

nt : non testé

Quatre des siARN testés (siARNs NPPR1, 6, 7 et 10) ont un effet significatif sur le PPRV. Parmi ceux-ci, seul le siARN NPPR1 permet d'atteindre un pourcentage de 90% d'inhibition de l'expression de la protéine N (les autres siARNs ne permettent pas d'atteindre 70% d'inhibition de l'expression) et un pourcentage de 89% d'inhibition de l'expression de la protéine M.

En ce qui concerne le RPV, seul le siARN NRP2 possède un effet significatif. Le siARN NRP1, qui ne

contient pas la totalité de la séquence cible, a un effet très amoindri.

Ces résultats montrent que le locus reconnu par les siARNs NPPR1, et NRP2 constitue une cible
5 particulièrement intéressante pour l'extinction du gène de la protéine N des morbillivirus. Cette cible est très circonscrite, puisqu'une base manquante diminue considérablement les effets obtenus.

10 **EXEMPLE 4 : EFFET INHIBITEUR DU siARN NPPR1 SUR LA SYNTHÈSE DES ARN VIRAUX.**

L'effet du siARN NPPR1 sur la réplication virale a été évalué en quantifiant la synthèse de l'ARN viral, comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes », dans des cellules VERO infectées par PPRV, non-transfectées, ou
15 transfectées avec 100 nM de l'un des siARNs NPPR1, NPPR3, NPPR2 ou GAPDH, ainsi que dans des cellules VERO non-infectées.

Les résultats sont illustrés par la figure 5.

Dans les cellules infectées non-transfectées, la
20 réplication virale se traduit par une quantité d'ARN viral 100 fois supérieure à celle apportée par l'inoculum initial. La transfection avec les siARNs NPPR2 et GAPDH n'a pas d'effet significatif sur la réplication virale. Dans les cellules transfectées avec NPPR3, la quantité d'ARN viral
25 demeure plus de 10 fois supérieure à celle apportée par l'inoculum initial. En revanche, dans les cellules transfectées avec NPPR1, la quantité d'ARN viral correspond à celle apportée par l'inoculum initial, ce qui confirme que ce siARN inhibe la réplication virale.

30 **EXEMPLE 5 : EFFET INHIBITEUR DU siARN NPPR1 SUR LA REPLICATION VIRALE MESURÉE PAR LE TITRE VIRAL**

L'effet du siARN NPPR1 sur la réplication virale a été évalué en mesurant le titre viral, comme décrit dans « Matériels et Méthodes », 4 jours après l'infection par
35 PPRV de cellules VERO transfectées avec 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100 nM de l'un des siARNs NPPR1, NPPR2, NPPR3, NPPR10 ou GAPDH.

Les résultats sont illustrés par la figure 6.

Pour les cellules transfectées par l'un des siARNs NPPR2, NPPR3 et NPPR10, on observe une légère diminution du titre viral par rapport au contrôle (cellules transfectées par le siARN GAPDH), qui ne varie pas
5 significativement en fonction de la concentration testée.

Pour les cellules transfectées par NPPR1, le titre viral diminue très significativement à partir de 12,5 nM de siARN. A 100 nM de siARN, on observe une inhibition totale de la réplication virale.

REVENDEICATIONS

1) ARN interférent, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre une région de l'ARNm du gène *N* codant pour la nucléoprotéine d'un morbillivirus, ladite région contenant le motif défini par la séquence générale suivante :

RRWYNNRHUGGUUHGARA (SEQ ID NO: 1)

dans laquelle :

A = Adénine

C = Cytosine

G = Guanine

U = Uracile

R = A ou G

Y = C ou U

W = A ou U

H = A ou C ou U

N = A ou C ou G ou U.

2) ARN interférent selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit motif est défini par une séquence cible choisie parmi :

- la séquence GGUUCGGAUGGUUCGAGA (SEQ ID NO: 2) ;

- la séquence AGUCUUACUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 3) ;

- la séquence GGAUCAACUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 4) ;

- la séquence AAUUAGGCUGGUUAGAGA (SEQ ID NO: 5) ;

- la séquence AAAUGGGCUGGUUAGAAA (SEQ ID NO: 6) ;

- la séquence GAACCCAUUGGUUUGAGA (SEQ ID NO: 7).

3) ARN interférent selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une portion de 19 à 29 pb d'une séquence antisens de celle du gène *N* d'un morbillivirus, ladite portion contenant un motif défini par la séquence générale UYUCDAACCADYNNRWYY (SEQ ID NO: 8), dans laquelle A, C, G, U, R, Y, W et N sont tels que définis ci-dessus, et D = G, A ou U.

4) ARN interférent selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les siARNs, les shARNs et les pre-miARNs.

5) Vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN pouvant être transcrite en un ARN interférent selon

une quelconque des revendications 1 à 4, placée sous contrôle d'un promoteur approprié.

6) Utilisation d'un ARN interférent selon une quelconque des revendications 1 à 4 pour l'obtention d'un
5 médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une infection à morbillivirus.

7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit ARN interférent est utilisé en combinaison avec au moins un autre ARN interférent choisi
10 parmi :

- un ARN interférent dirigé contre une région de l'ARNm du gène N contenant un motif défini par la séquence générale GSMGRUUYAUGGUVKCDYU (SEQ ID NO : 15), dans laquelle A, C, G, U, R, Y, et D sont tels que définis ci dessus et M
15 = A ou C, K = G ou U, S = G ou C, V = G, A ou C ;

- un ARN interférent dirigé contre une région de l'ARNm du gène N contenant un motif défini par la séquence générale GCHYUDGGNYUDCAYGARU (SEQ ID NO : 16) dans laquelle A, C, G, U, R, Y, D, H, et N sont tels que définis ci-
20 dessus.

8) Utilisation selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que ledit morbillivirus est choisi dans le groupe constitué du virus de la rougeole (MV), du virus de la peste bovine (RPV), du
25 virus de la peste des petits ruminants (PPRV), du virus de la maladie de Carré (CDV), du virus de la peste des phoques (PDV), et du morbillivirus du dauphin (DMV).

9) Composition pharmaceutique comprenant un ARN interférent selon une quelconque des revendications 1 à 4.

30 10) Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un ARN interférent tel que défini dans la revendication 7.

11) Composition pharmaceutique selon une
35 quelconque des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin.

1/12



Figure 1

		1		70
N MV	(1)C.A.....TA.....A..GC...A...G..A.A...G.G.....C..A...T.A.G.		
N PPRV	(1)G...A.....CTG..G....G....GG...AGC...A.C..TG.CC.....C.....A		
N RPV	(1)C.A.....GA.T..AG....C...A...A.....C.TT..A.....T....CT.G...		
N CDV	(1)	...G.C.....C.T.A.A.A...A.GC.....C..ACC.A...T.....GC.....A		
N PDV	(1)	--.G.C.....GTC-TCA....G.A...C.....C..ACC.A...CA.....C.G.....C..A		
N DMV	(1)AATT..C.....T..A.A.....CA.AGTC.....G..A.....CG.		
Consensus	(1)	AGGATTAATGATCCTATC TCAGGGACAGGATTAGGGTTAAGGTTTTCCAA <u>ATGG</u> CTACTCTTCTTAAG		
		71		140
N MV	(71)A..A.A.....A..A.A.....A..C..T..A.....		
N PPRV	(71)G.....A...A.....G.G..TAC...G..G..T..A..A.....C.G.		
N RPV	(71)TC.....A..G...A.....G.....G....C..T..T....T...C.G.		
N CDV	(71)	...C.CA..C.....TCG....C....C..T....C..T..C..C..G..A..A..A....		
N PDV	(68)	...C.GAGC.....A.A...A.G...AC....C..AT.G.....A..T..C.....A..A....		
N DMV	(71)	..TC....TC.....A...A..T.G.A.....AAT.G....T..A..A..A.....A....		
Consensus	(71)	AGCTTAGCATTGTTCAAGAGGACCAAGGACAAACCACCCCTTGCTTCAGG TC GG GGGGCCATCAGAG		
		141		210
N MV	(141)	.A..C..A..CA.....A.....A.....C..A...AC....C....C.....TC....		
N PPRV	(141)T...A.....C.....C..T..C..G..C.....CA.T..CC.T.....GC.C..		
N RPV	(141)	.A..C..A.....C...G.T..T..G..T....G....C..A..CAC...A.....CC.C..CC.A..		
N CDV	(141)	.A..A.....C.....T.....G.....AG.....T..A....TC.....		
N PDV	(138)A..A.....TTG.....C..GAG.....A.....		
N DMV	(141)T.....CG.....G.A..C.....G.....G.....T.....		
Consensus	(141)	GGAT AAGCATGTTATTATAGTCCCAATCCCTGGTGATTCATCCATTGTCACTAGATCAAGACTATTGGA		
		211		280
N MV	(211)	.C..T.G....G..AA....A...G..TG.G..C..G..C..AC.A..A...CA..A..AG....A		
N PPRV	(211)CC....T....C....AC..GT.A...C.....C..GA.....C..G		
N RPV	(211)	.C.T..C..T.A.A...G.....A..C.....C.....A..A.....CT..C....C...		
N CDV	(211)	T..A....T..G.....T..T..AA.A...AC..C.....A..A..T...A.CT.A.....		
N PDV	(208)	...A.....A.....AG.T....T..C.....T.....C...		
N DMV	(211)T.A..A...C.T.C...T.....T.T..A....A.....C....A..C..CA.....A		
Consensus	(211)	CAGGCTTGTCAGATTGGTTGGAGACCCTGA ATCAGTGG CCTAAGTTGACCGGGGT CTGATCAGTATC		

Figure 2

		281		350
N MV	(281)C..A.....T..A..T.....C.....C..T....A.		
N PPRV	(281)T....C.....C..G.....A...C.....A.....T..A.....T.....C		
N RPV	(281)C.....C.....A..C...C.T.....A.....A.....T.		
N CDV	(281)	C.C..C.....A..C..T..A..G....C.....TA..C.....A.....		
N PDV	(278)	C.C....A....A..A..C..T..A..G..A.....A...T.....T....CA...T..A.		
N DMV	(281)	C.....T..A....CA.T...C.A..A...C.A.....C....A.....		
Consensus	(281)	TTATCATTGTTTGTGGAGTCACC GG CAATTGATTTCAGAGGATCACTGATGACCCTGATGTCAGCATCA		
		351		420
N MV	(351)	..C.GT.A....T....G.....C....A.....T..C.....C..C.....A.....A.C.AC..		
N PPRV	(351)	.CC.T..T.....T.....ACT.G...C..G.....T.G..C.....AC.T....TGA.T.		
N RPV	(351)	AA..G..G.....AA.....A.....G.....C..T..G...A.G..C..		
N CDV	(351)	A.....A.....A.A.C...CAT...C...GCT.G...T.....A..A..C.		
N PDV	(348)	A.....G.....A.A.CC...ATT..T..ACC.G...T.....G..CT.		
N DMV	(351)	.A.....T..A..A.....G.....C.T...A.....C..T.....C..T.A...		
Consensus	(351)	GGTTAGT GAGGTAGTCCAAAGTGACAAGTCTCAATCCGGGCTTACATTTGCATCCAGAGGTGC AGTAT		
		421		490
N MV	(421)	...G.....G..CC.A..C..T...CA...T..TC.AAT.AGTA.T.....TCCA.....A...		
N PPRV	(421)	...CA.....A...AT.....T...C.....G.C.CTCGAGT...AG.A.G.AAA	GGATCAACTGG	siARN-NPPR1
N RPV	(421)C.....T...AGA.....A.TTA.....C.CAA.GAC....AG....	GCAGTCTTACTGG	siARN-NRP1 et NRP2
N CDV	(421)TC.....A.....TC...AA..T..T...C.AA.GGTCGAA..C....G.G.AA..A.....		
N PDV	(418)C...A..T.....T....GGG.C.ATG..C.AG.G.TCAAAG....T.AT.AAA.G.....		
N DMV	(421)	...G.....G.....C.....T.T.C...C..GG.AGGAA..G..CACC..AG.AAC.CAT...		
Consensus	(421)	GGATGATGAGGC GATGAGTATTTCTCAA TGAAGAAGC G T GGAGATCAAAG CGGTTCGGCTGG		
		491		560
N MV	(491)	..C.....C..G..A..CTC...T....A.....CC.T....GA.....C...A.T....GTA...		
N PPRV	(491)	TTTGAGAA	C.G...A...A.....A.....A.....GT.A..C....	siARN-NPPR1 (suite)
N RPV	(491)	TTTGAGA	.CG.....TCA.....A.C..G...C...A.G.....A.....AA...	siARN-NRP1 et NRP2
N CDV	(491)	..A.....G.....G.....A..A..TG.TA...T...C.A.....A..G..A..T....		
N PDV	(488)	..A..A.....A.C....C.....A.T..C.....C.....C....A..G..A.		
N DMV	(491)C.....G...G.T..A.....T....CC...A..A....C..AC..T...A..T.		
Consensus	(491)	TTTGAGAATAAAGATATA TAGACATTGAGGTGCAAGATGCAGAGGAGTTCAATATGTTACTGGC TCCA		

Figure 2 (suite)

		561		630
N MV	(561)	..C...C.....G.....C..A.....T..G..C.....C..G.....G...C.		
N PPRV	(561)A..G.....C.C..G.....T..G..A..G.....G.....C.....AC.		
N RPV	(561)C..G..C.....A.....T..A..A..C..A..C..T.....C.....T.		
N CDV	(561)G..T.....C.....T..A.....G.....T.....C..C..G.....		
N PDV	(558)	..C.G..T.....C.....T.....T..A.....C.....G.....A..		
N DMV	(561)	.TC.T..A.....C.AT.....A..C.....C.....C..C....C		
Consensus	(561)	TCTTAGC CAAATTTGGATCTTGCTAGCCAAGGCGGT ACTGCTCCAGATACTGCAGCTGATTCAGAGAT		
		631		700
N MV	(631)	A.....A.....C..A.....A.G..A.....T.....T.G..G.G.AA....T.G		
N PPRV	(631)G...A.....A..A.....GA.A..A...G.....C.C.....G....G		
N RPV	(631)	AC.G.....G.G..A.....A.....GA.G..AA.....C.....		
N CDV	(631)T..C.....C.....A.GA....ATC.....		
N PDV	(628)A.....G.....A.A.....A.GA.T...AT.....		
N DMV	(631)	...GC.....A..T.....C.C....A..G..T..G..C.G.....G.....T.G		
Consensus	(631)	GAGAAGGTGGATTAAGTACACTCAGCAAAGACGTGTGTTGGAGAATTTAGACTTGACAAAGGATGGCTT		
		701		770
N MV	(701)G.....G.....C.....C..C..C..A..C.....C..TC....C.G....		
N PPRV	(701)	..C.C...CC.C.....A..A.....AC.T. <u>GGCGGTTCATGGTATCTCT</u> C..AC.T..C.	siRNA-NPPR6	
N RPV	(701)	..CAC....C.C.....G.A..A..A.....C.....A..CA...T.....G.....		
N CDV	(701)	...A.T..T..A.....T.....C.....A.....GC.C....G..C.		
N PDV	(698)	...A...T..G....A.....T.....T.G.....A.....T.....A.....		
N DMV	(701)CT....A..TC.....G.....C.....G..A..A.....T.....		
Consensus	(701)	GATGTAGTGAG AACAGGATTGC GAGGATCTATCTTGC GGCGGATTCATGGTGGCATTAACTCTTAGATA		
		771		840
N MV	(771)A..C..A.....C.....A.....A.....A.....C.....		
N PPRV	(771)A..G.....C.....G.....A.....C.....C.A.....T.....		
N RPV	(771)T.....C.....C.....C..A..G..		
N CDV	(771)	...AC..T.....G.....G..T..A.....T.....T..A...A...C..T..G..		
N PDV	(768)	...A..GT.T..G.....T.....A.....C.....T..A..C.A.....A.....		
N DMV	(771)A.....G.....C.....C..G.....A..C.....A..C.....C..C..		
Consensus	(771)	TCAAGAGAACCCCAGGCAACAAACCAAGGATTGCTGAAATGATCTGTGACATTGATACCTATAT GTAGA		

Figure 2 (suite)

```

      841                                     910
N MV      (841) .....A..A.....G.....T..G.....G..A.....T..T.....A...
N PPRV     (841) A..C..AC.CGCCAGTTTCATTCTTACT.....T..T.....C.....TGCATTAGGCCTT siARN-NPPR3/NPPR10 puis NPPR7
N RPV      (841) .....G..G.....A..C.....T..A.....G.....C..A.....G..C...
N CDV      (841) A..T..G..A..T.....C.....G.....C..T.....T.....GT..
N PDV      (838) A..T..CC.G..A..C.....T.....C..C.....C.....T..A
N DMV      (841) .....TC.T..T..C..C.....C..G..C.....A.....C.....CT.A..GT..
Consensus (841) GGCAGG TT GCCAGTTTTATCCTAACTATCAAATTTGG AT GAAACTATGTATCCGGCACTTGG CTG
      911                                     980
N MV      (911) .....A..TG.T..T.....C.....T.G.....T..C..G..A.....G.....
N PPRV     (911) CACGAGT..G....G..A..G.....T.....A..T.G.....T.GATCAACAGCTAGGAGAGGT.. siARN-NPPR7 (suite) et NPPR8
N RPV      (911) .....A..G.....C.C.....C.....T..T.....T..G..C..G..A.....CTG.
N CDV      (911) .....T.....A..A.A..T.....A.....C...TG..A.....A.
N PDV      (908) .....T.....GA.A..C.....A..A..T..GTTT.A.....G.
N DMV      (911) .....A.....G..T..A..A.T..G.....T..A.....C..C.....C..G....
Consensus (911) CATGAGTTCTCCGGAGAGTTATCCACAATTGAGTCCCT ATGAACCT TATCAACAGATGGGTGAACTG
      981                                     1050
N MV      (981) ....C.....A..C..G.....T.....
N PPRV     (981) ....C.....ASAGAACTCAATTCAGAACAA.....T.....G.C..T..T..C..... siARN-NPPR5
N RPV      (981) .T..T..T.....CT.A.....C.....G.....C..T.G..
N CDV      (981) .....T..CT.G..A.....TG....A.....A..T....,....G..C.....AT.....
N PDV      (978) .....T.....T.....G.....T..A.....C..T..T..GT...T..
N DMV      (981) .....A.....T..A.....T.....G..AT.A..
Consensus (981) CACCGTACATGGTGATTCT GAGAACTCAATTCAGAACAAAGTTCAGTGCAGGATCATACCC CTGCTCTG
      1051                                     1120
N MV      (1051) .....C.....A.....G.....A..C.....T..G..C.....C.....
N PPRV     (1051) .....G.....T..C.....C..GT.G.....C..A.....G..CC.GAACTTTGGCAGGTCATAT siRNA-NPPR9
N RPV      (1051) .....GA....G.....T.A.....T.....G..AC.T.....CA.G..G...
N CDV      (1051) ...T.....G.....T.....A..C.....G..A.....C.....
N PDV      (1048) ...T.....C..G..C..G.....G..A..C..C.....
N DMV      (1051) .....A.....A.....A.....T..AC.T.....T.....
Consensus (1051) GAGCTATGCTATGGGAGTTGGAGTTGAACTTGAGAATTCATGGGAGG TT AATTTTGGTCGATCTTAC

```

Figure 2 (suite)

		1121		1190
N MV	(1121)T.....T...T.A..G.....A.....G..A.....A.....T..C...T		
N PPRV	(1121)G..C.....C.T..C..A..G.....A.....A.....A.....GT.A		
N RPV	(1121)T.....T.A..A.....A.....G..A.....G.....C.AC.		
N CDV	(1121)T..C.....C..G.....A.....T.....C..C..A..A.....G...		
N PDV	(1118)T..C...C...T..T....A.....T.....T..A..G.....T		
N DMV	(1121)	..C.....T.....G..T.....A..A..C.....G.....AT.G.		
Consensus	(1121)	TTTGACCCAGCATATTTTCAGACT GG CAAGAGATGGTCAGGAGATCTGCTGG AAGGTCAGCTCTACAC		
		1191		1260
N MV	(1191)	.G..AT....A..C..T....T..C.....T..A.GG.....T.....T...ATG..T.....		
N PPRV	(1191)	.C..G.....T....A..A.....C.....A.....G..A..C..C.....GGG..		
N RPV	(1191)	.G..AT.....C.....AG.....A.G.....T....C..G..T.C..A.G...		
N CDV	(1191)	.T..C..C.....AAG.....TC.G..A..G.....A..A.....CA...A..A..		
N PDV	(1188)	.T..G..C..AT.....AAA.....G..GC...A..G.....A..A.T...AGA..A..C..		
N DMV	(1191)	.A..C..A..A..A..G.....A..C.....C..C.....C.....T..TG.G...G..A...		
Consensus	(1191)	T GC GCTGAGCTTGGCATCACCGC GAGGAAGC AACTTGTCTCAGAGAT GCATCACAGACTACTGA		
		1261		1330
N MV	(1261)	G...AA..T..G.....GGT...A..C.G.....A..A.....A...GG...TCA.AG---		
N PPRV	(1261)	T..A..A...GTC....GG....G...CG...G..G.....C..C..C..GCA.A...C.GA---		
N RPV	(1261)	T..T....A..A...A.CT...A..C.....G.....T.....C..T.G.A.C..TCA.-----		
N CDV	(1261)	G.....A.T.C...T.....G...T...AA..A.T....G...T.G.....TC--C		
N PDV	(1258)	A..TA.A..A.C...G..A.....T....A..A.....A..T.....AA---		
N DMV	(1261)	C...A.AG.T.A.....A.TA.....AA....A.A..G.....T..TC...C...GGCGA.		
Consensus	(1261)	GACCGGACCA TAGAGC ACTGGTCCTAAACAAGCCCAGGTCTCATTCT CAC CTGAAAGA T		
		1331		1400
N MV	(1328)	...AA..A.CTA.C..G.T.G.GGG...AGG.A..T--A.GA..G..AA..A...TC...G...-.....		
N PPRV	(1328)A.A.T.G.CT.C..CA..G.C..GAG.A..A.TCAAA.CTG.GAT..C.AA..G.TCCG...GA.		
N RPV	(1325)	.G.A...A.G.C...C.CAG...A...AG..A..T.AA..TA..G.A.C..AG.TCA.....G..A...		
N CDV	(1328)	..A.TC..CAAT..AC...C.C.A.C..TC...A..AGGT.C.A.AAC..GG...GA..C..AT.CC...		
N PDV	(1325)	..A.CAC.TAAC..A.G....C.TCC..TC.C.AT.AAGT.T.A..TC..AG...G...T...T.TT...		
N DMV	(1331)	.CCA..A.TC.AGG...CA..CTTC..GCA.....GT.AC..G..-....CG.A..A...--..GGG		
Consensus	(1331)	GAGGGTGCG C CAGAACTCGC AGCA AACGAGG GC GGATC CACCGAG TGAGAAG AAGCCA		

Figure 2 (suite)

		1401		1470
N MV	(1395)	..G.G.G.TA....GA..C..G.....CAG..CA-..T....CG.GAG.TGCC.....T.--..A.C.G		
N PPRV	(1398)	..G...---..A.G.G...A...T....AA..C.....GA..A.CTC..GGC..A....--TTC.G..		
N RPV	(1395)	..AC..G..G..AGT..G..AA..A..A..A..GT-.C...CA-.GAA..TGTA.G..C.T-....TAT		
N CDV	(1398)	TTC..T...-GT..CG...G..TT.....T...CC.....T-----AACAGT....AATGGAGT..		
N PDV	(1395)	ATC.GC...-TT..TG.TCG..TGT.T....T..TTCT....T-----T.AAT.....AATGG.AC..		
N DMV	(1398)	..A....TGCT.C.C....A.G.A.A..CA....T....C..C.-----A.GA..CT--....AA.		
Consensus	(1401)	GG ACATCA CAGA CAAACGCGCCAGGGTAGACCAGAGATGA A CC CATCTGC CAGC GA		
		1471		1540
N MV	(1462)	C....C.....C.CTG.ATCG...T.CA.C..A..T..G..G..C.G..G..GG.....C		
N PPRV	(1462)	..TCA.G.A...GGA....C.CT.G.GA...T.TA...AA.C..T.G...GGC.....G..G.....		
N RPV	(1462)	...T..GA.T..TG.G..C.CA..C.TC....A.A.AC...T..T.TA..G.GCA.G..G....A...		
N CDV	(1462)	.T...G.TAT....CCC....T.TC.AA..T.AT..AA....-.-G....---.GG.....GATG..A		
N PDV	(1459)	.T...G..AGAT..CAC..T.G..A.AG..A.GG.AC.....-.-A....---....C.....ATG..C		
N DMV	(1457)-.....TGAACAGTCC..CAACAC.G.C..C..AAT.AGT.TC.....		
Consensus	(1471)	GACACTCCTAGACATTGAAAT AC C GAGGC GGTCATGA CC CATGA A TCAAAAATCAGCTGAG		
		1541		1610
N MV	(1532)	..C..GC.T.....AA.....AGGA..C.C...A..A.A....T.A.ACACG....CCC..ATA.		
N PPRV	(1532)T.....A.....TC....G....AG.AGGAG..A..A....ACAG..AGA		
N RPV	(1532)	..T..TC.T..A....A...T.....GGC..C..A.GG...T..AC.CTT..CA.T....G.CTGAGA.		
N CDV	(1526)	...A...C..A.A..A..ATGC.TA.T....GC.CAGTC.A..T..GA.CA....A..T.A.T...CT.		
N PDV	(1523)	.GT....C..AAA..A.ACAGC.CA.....TC.AA.TC.GT...ATA.AAA..GG..GGTCT.C.CT.		
N DMV	(1526)	...T.A.C..A.A..A.A.....C.A....AA..A....C.GC....T.T..C.G.G.AC.		
Consensus	(1541)	GCACTCGTCAGGCTGCGGGCCATGGCCAAGAT TTGGA GACCCAGGC C GGTGA GACA T CTC G		
		1611		1680
N MV	(1602)	.G..C.....GAA....T..AGA..AG..GCG...GG..GAG.A-...A...A....CGC.T.C.C.		
N PPRV	(1602)	.C..C..C.....C.....C.GAC.C.C..TCC.T-..AAT..GTGA...GA....GC		
N RPV	(1602)	CA..C..C.....T....A.....GAGT.CCC.GCAC.CTT.....GCA...TCC....GCA		
N CDV	(1596)G...T..A..G..A....AT.A.A..TTCA.GA..AGTCTTG..T..G-T..A...TTATCA..		
N PDV	(1593)	C.C.....G...C..G.....A...TCC.A..GA.ATT.CAGA.T..A.TG.AAC.TG.....		
N DMV	(1596)T..A.....A..TG....AC.AA..G.T....-A.T.T.AG..G.G...GA.TT.G.A		
Consensus	(1611)	TTTATAATGACAAGGATCT CTCAGCTGAGTA AGAA CC G C CAGCACA CATCAA CCATCTT		

Figure 2 (suite)

	1681	1702
N MV	(1671)	.C---.T..T.G.....
N PPRV	(1671)	.C---GC..G.....
N RPV	(1672)	A----.G.GCC.....
N CDV	(1665)	.T---.AACTC.....
N PDV	(1663)	.----.AGCCA.....
N DMV	(1662)	TTTTC.T..A.....C.....
Consensus	(1681)	C A CA TATTATAAAAAA

Figure 2 (fin)

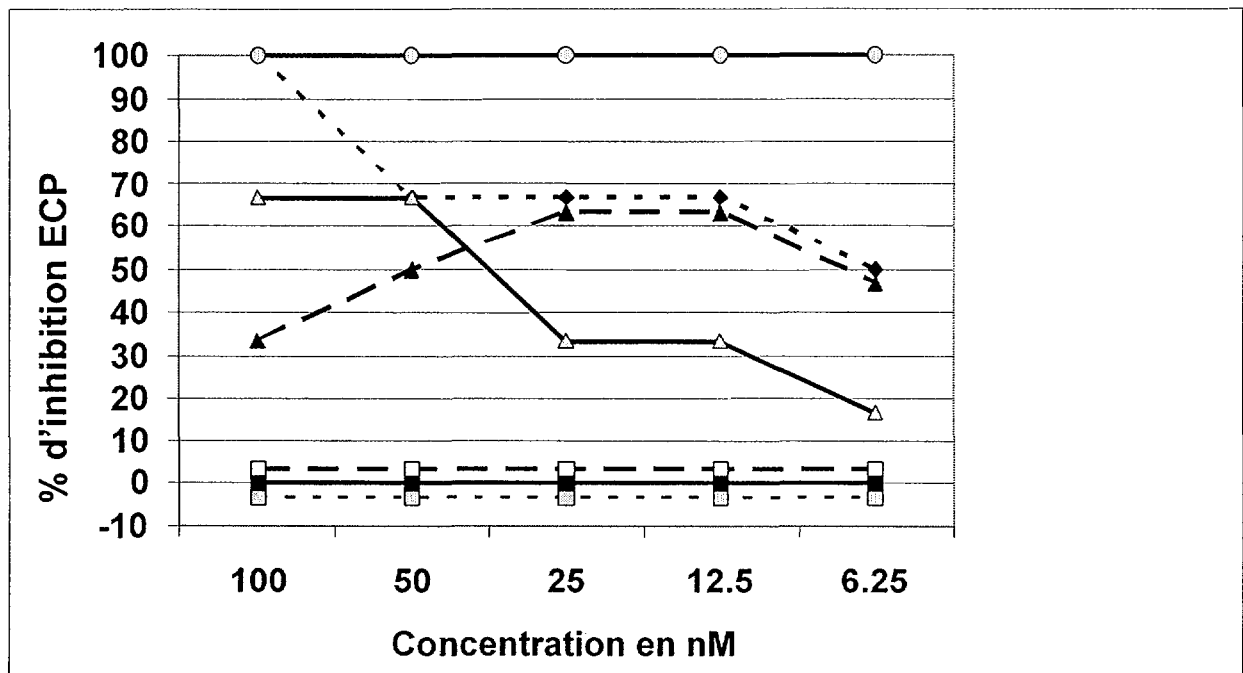


Figure 3

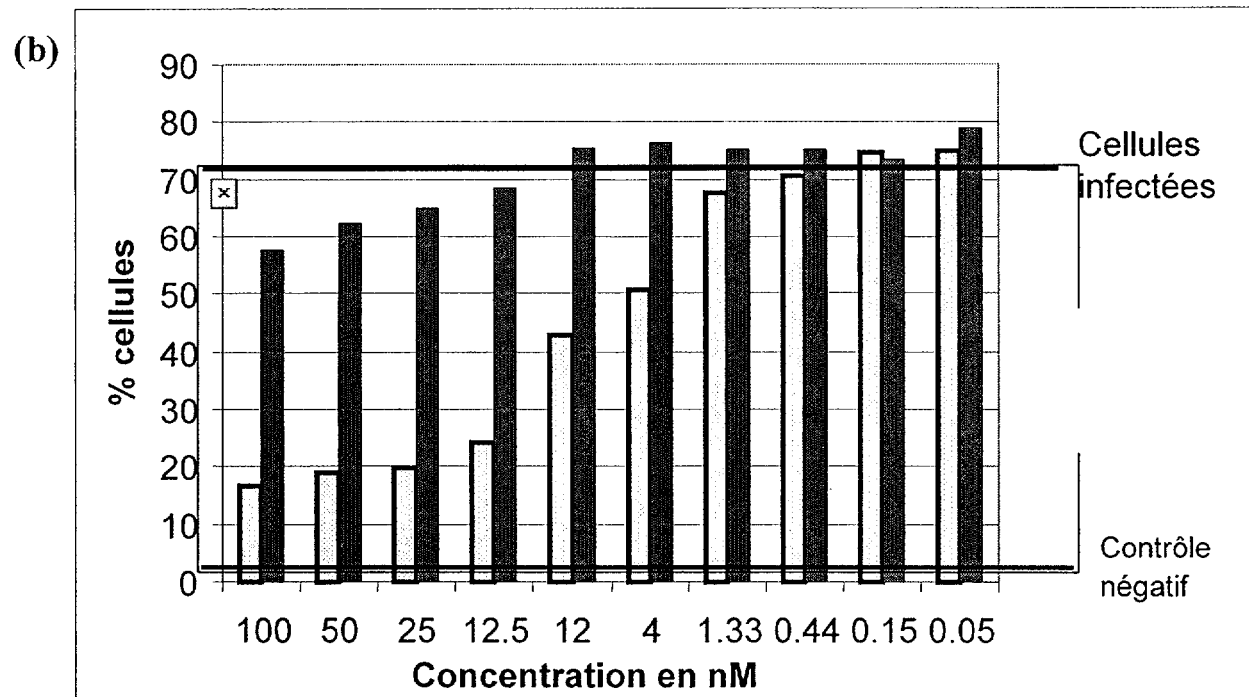
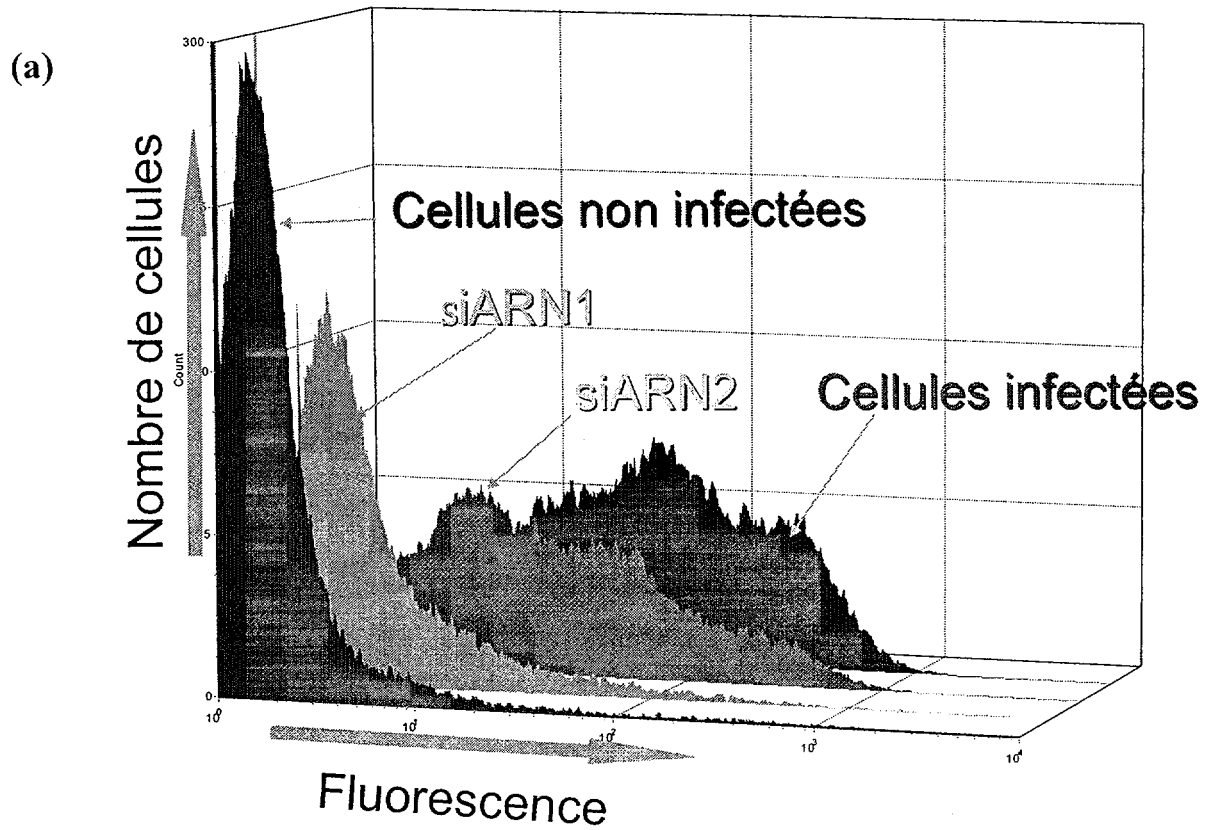


Figure 4

Nombre de copies d'ARN NPPR

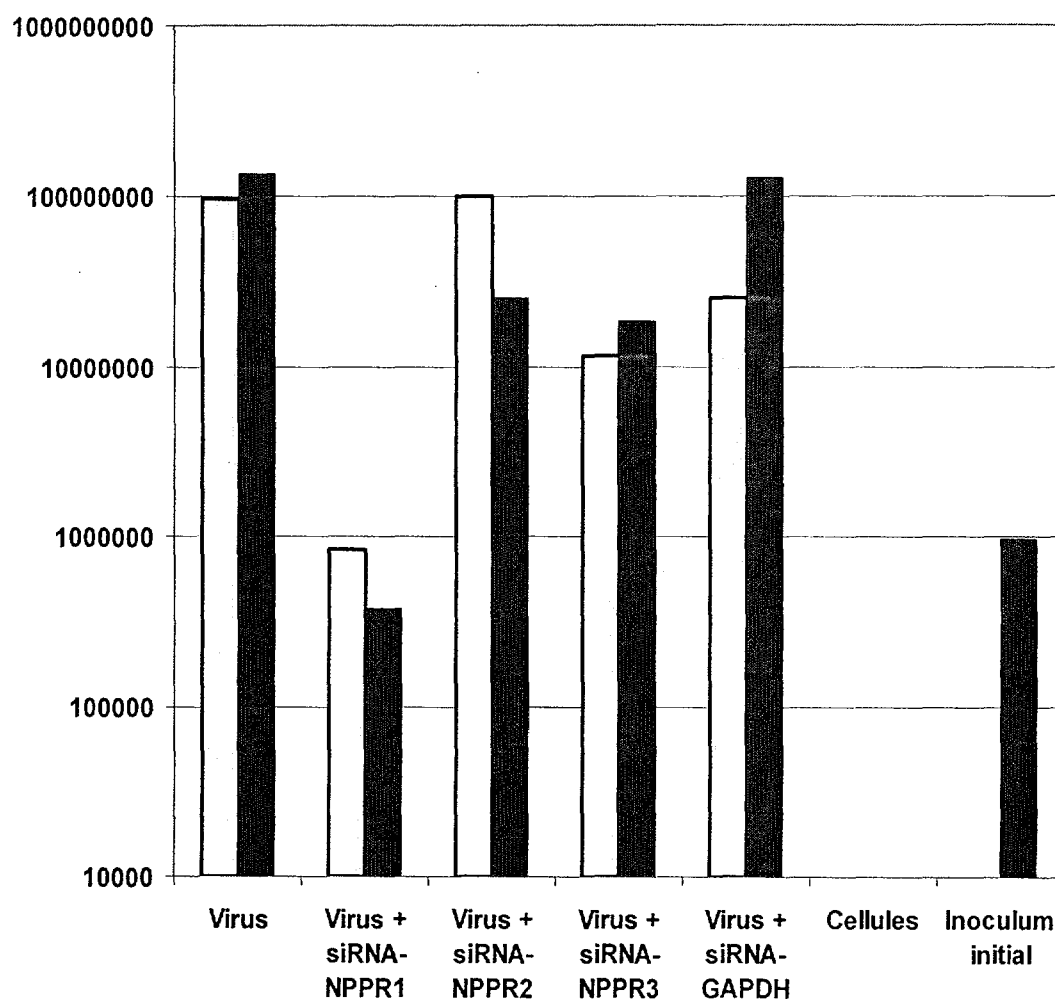


Figure 5

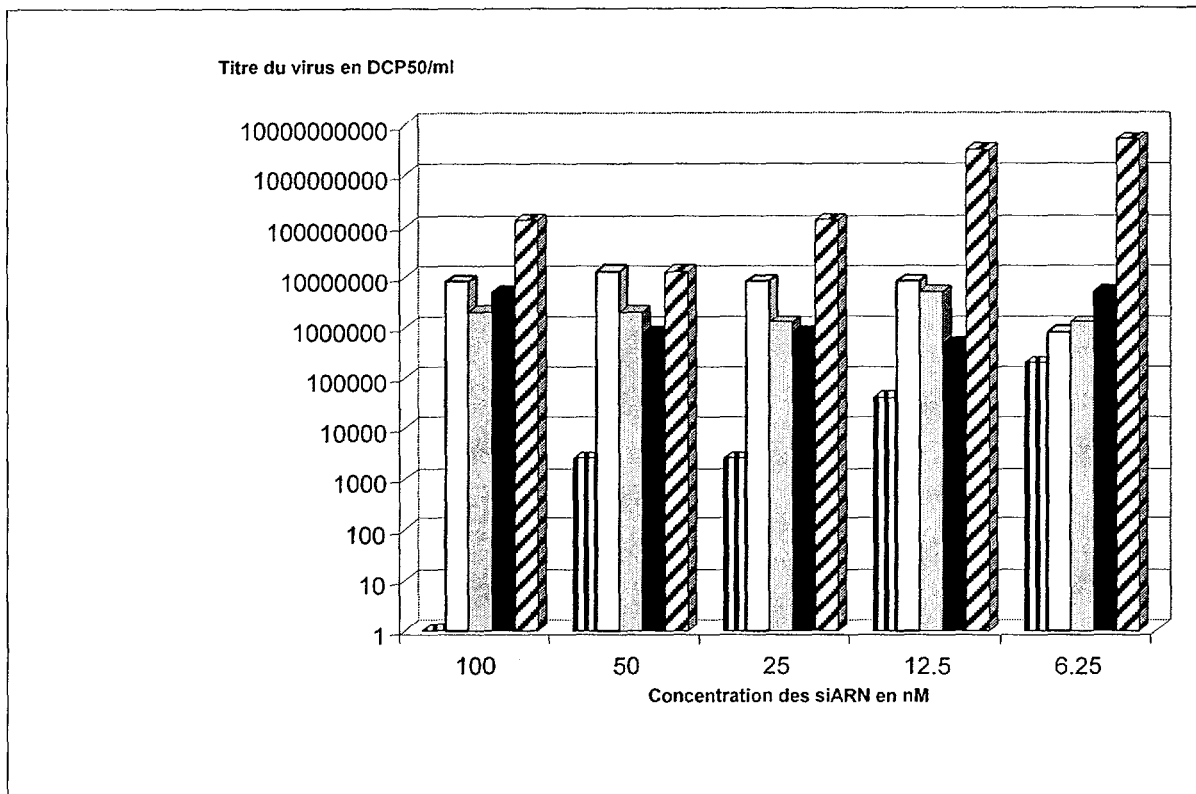


Figure 6

1
SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD)

<120> ARN INTERFERENTS CIBLANT LE GENE DE LA NUCLEOPROTEINE DE
MORBILLIVIRUS

<130> MJPbv1367-10

<160> 74

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 18
<212> RNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> séquence cible 1

<220>
<221> misc_feature
<223> r = a ou g ; y = c ou u ; w = a ou u ; h = a, c ou u ; n = a, c,
g ou u

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> n is a, c, g, or u

<400> 1
rrwynnrhug guuhgara 18

<210> 2
<211> 18
<212> RNA
<213> Measles virus

<400> 2
gguucggaug guucgaga 18

<210> 3
<211> 18
<212> RNA
<213> Rinderpest virus

<400> 3
agucuacug guuugaga 18

<210> 4
<211> 18
<212> RNA
<213> Peste-des-petits-ruminants virus

<400> 4
ggaucaacug guuugaga 18

<210> 5
<211> 18

<212> RNA
 <213> canine distemper virus

<400> 5
 aaauaggcug guuagaga 18

<210> 6
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Phocine distemper virus

<400> 6
 aaaugggcug guuagaaa 18

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Dolphin morbillivirus

<400> 7
 gaaccgauug guuugaga 18

<210> 8
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence consensus ARN interférant 1

<220>
 <221> misc_feature
 <223> r = a ou g ; y = c ou u ; w = a ou u ; d = a, g ou u ; h = a, c
 ou u ; n = a, c, g ou u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> n is a, c, g, or u

<400> 8
 uyucdaacca dynnrwyy 18

<210> 9
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Measles virus

<400> 9
 ucucgaacca uccgaacc 18

<210> 10
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Rinderpest virus

<400> 10
 ucucaaacca guaagacu 18

<210> 11
 <211> 18

3

<212> RNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 11
 ucucuaacca guugaucc 18

 <210> 12
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> canine distemper virus

 <400> 12
 ucucuaacca gccuaauu 18

 <210> 13
 <211> 18
 <212> RNA
 <213> Phocine distemper virus

 <400> 13
 uuucuaacca gcccauuu 18

 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Dolphin morbillivirus

 <400> 14
 ucucuaacca auggguuc 18

 <210> 15
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> séquence cible 2

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> r = a ou g ; y = c ou u ; m = a ou c ; d = a, g ou u ; v = g, a
 ou c ; k = g ou u ; s = g ou c

 <400> 15
 gsmgruuyau gguvkcdyu 19

 <210> 16
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> séquence cible 3

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> r = a ou g ; y = c ou u ; h = a, c ou u ; d = a, g ou u ; n = a,
 c, g ou u

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (9)..(9)
 <223> n is a, c, g, or u

<400> 16
 gchyudggny udcaýgaru 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Measles virus

<400> 17
 gccgauucau ggucgcucu 19

<210> 18
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Measles virus

<400> 18
 gcucuuggac ugcaugaau 19

<210> 19
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Rinderpest virus

<400> 19
 gcagauuuau gguggcauu 19

<210> 20
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Rinderpest virus

<400> 20
 gcacugggcc ugcaugaau 19

<210> 21
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

<400> 21
 ggcgguucau gguaucucu 19

<210> 22
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

<400> 22
 gcauuaggcc uucacgagu 19

<210> 23
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> canine distemper virus

<400> 23
 ggcgauucau gguggcgcu 19

<210> 24
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> canine distemper virus

 <400> 24
 gcucuugggu ugcaugagu 19

 <210> 25
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Phocine distemper virus

 <400> 25
 ggcgauuuau gguggcauu 19

 <210> 26
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Phocine distemper virus

 <400> 26
 gcacuugguc uacaugagu 19

 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Dolphin morbillivirus

 <400> 27
 ggagauucau gguggcauu 19

 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Dolphin morbillivirus

 <400> 28
 gccuuagggg ugcaugaau 19

 <210> 29
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> séquence consensus ARN interférant 2

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> r = a ou g ; y = c ou u ; m = a ou c ; b = g, u ou c ; h = a, c
 ou u ; k = g ou u ; s = g ou c

 <400> 29
 arhgmbacca uraaycksc 19

 <210> 30
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

```

<220>
<223>  séquence consensus ARN interférant 3

<220>
<221>  misc_feature
<223>  r = a ou g ; y = c ou u ; d = g, a ou u ; h = a, c ou u ; n = a,
      c, g ou u

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (11)..(11)
<223>  n is a, c, g, or u

<400>  30
ayucrughar ncchardgc                                     19

<210>  31
<211>  19
<212>  RNA
<213>  Measles virus

<400>  31
agagcgacca ugaaucggc                                     19

<210>  32
<211>  19
<212>  RNA
<213>  Measles virus

<400>  32
aucaugcag uccaagagc                                     19

<210>  33
<211>  19
<212>  RNA
<213>  Rinderpest virus

<400>  33
aaugccacca uaaaucugc                                     19

<210>  34
<211>  19
<212>  RNA
<213>  Rinderpest virus

<400>  34
aucaugcag gccagugc                                       19

<210>  35
<211>  19
<212>  RNA
<213>  Peste-des-petits-ruminants virus

<400>  35
agagauacca ugaaccgcc                                     19

<210>  36
<211>  19
<212>  RNA
<213>  Peste-des-petits-ruminants virus

```

<400> 36
 acucgugaag gccuaaugc 19

 <210> 37
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> canine distemper virus

 <400> 37
 agcgccacca ugaauugcc 19

 <210> 38
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> canine distemper virus

 <400> 38
 acucaugcaa cccaagagc 19

 <210> 39
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Phocine distemper virus

 <400> 39
 aaugccacca uaaauugcc 19

 <210> 40
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Phocine distemper virus

 <400> 40
 acucauguag accaagugc 19

 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Dolphin morbillivirus

 <400> 41
 aaugccacca ugaauucc 19

 <210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Dolphin morbillivirus

 <400> 42
 auucaugcaa cccuaaggc 19

 <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Amorce PCR NP3bis

 <400> 43
 gtctcgaaa tcgcctcaca g 21

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Amorice PCR NP4bis

 <400> 44
 cctcctcctg gtcctccaga a 21

 <210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 45
 ggaucaacug guuugagaat t 21

 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 46
 uucucaaaacc aguugaucct t 21

 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 47
 gcucaccuuc auucuuuuct t 21

 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 48
 gaaaagaaug aaggugagct c 21

 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 49
 ggccaguuc auucuuacut t 21

 <210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 50
 aguaagaaug aaacuggcct c 21

 <210> 51
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 51
 gagaacucua uucagaacat t 21

 <210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 52
 uguucugaau ugaguucuct t 21

 <210> 53
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 53
 ggcgguucau gguaucucut t 21

 <210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 54
 agagauacca ugaaccgcct t 21

 <210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 55
 gcuuaggcc uucacgagut t 21

 <210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 56
 acucgugaag gccuaaugct t 21

 <210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 57
 guaucaacag cuaggagagt t 21

 <210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 58
 cucuccuagc uguugauact t 21

10

<210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 59
 gaacuuuggc aggucauaut t 21

 <210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 60
 auaugaccug ccaaaguuct t 21

 <210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 61
 cgccaguunc auucuuacut t 21

 <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

 <400> 62
 aguaagaaug aaacuggcgt t 21

 <210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rinderpest virus

 <400> 63
 gcagucuac ugguuugagt t 21

 <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rinderpest virus

 <400> 64
 cucaaaccag uaagacugct t 21

 <210> 65
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rinderpest virus

 <400> 65
 cagucuacu gguuugagat t 21

 <210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rinderpest virus

<400> 66
 ucucaaacca guaagacugt c 21

<210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> siARN-GAPDH sens

<400> 67
 aaggucaucc augacaacut t 21

<210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> siARN-GAPDH antisens

<400> 68
 aguugucaug gaugaccuut t 21

<210> 69
 <211> 1689
 <212> DNA
 <213> Measles virus

<400> 69
 aggattcaag atcctattat cagggacaag agcaggatta gggatatccg agatggccac 60
 acttttaagg agcttagcat tgttcaaaag aaacaaggac aaaccaccca ttacatcagg 120
 atccggtgga gccatcagag gaatcaaaca cattattata gtaccaatcc ctggagattc 180
 ctcaattacc actcgatcca gacttctgga ccggttggtc aggttaattg gaaacccgga 240
 tgtgagcggg cccaaactaa caggggcact aataggtata ttatccttat ttgtggagtc 300
 tccagggtcaa ttgattcaga ggatcaccga tgaccctgac gttagcataa ggctgttaga 360
 gggtgtccag agtgaccagt cacaatctgg cettaccttc gcatcaagag gtaccaacat 420
 ggaggatgag gcggaccaat acttttcaca tgatgatcca attagtagtg atcaatccag 480
 gttcggatgg ttcgagaaca aggaaatctc agatattgaa gtgcaagacc ctgagggatt 540
 caacatgatt ctgggtacca tcctagccca aatttggttc ttgctcgcaa aggcggttac 600
 ggccccagac acggcagctg attcggagct aagaaggtgg ataaagtaca cccaacaaag 660
 aagggtagtt ggtgaattta gattggagag aaaatggttg gatgtggtga ggaacaggat 720
 tgccgaggac ctctccttac gccgattcat ggtcgctcta atcctggata tcaagagaac 780
 acccggaac aaaccagga ttgctgaaat gatatgtgac attgatacat atatcgtaga 840
 ggcaggatta gccagtttta tcctgactat taagtttggg atagaaacta tgtatcctgc 900
 tcttggaactg catgaatttg ctggtgagtt atccacactt gagtccttga tgaaccttta 960
 ccagcaaagt ggggaaactg caccctacat ggtaatcctg gagaactcaa ttcagaacaa 1020
 gttcagtgca ggatcatacc ctctgctctg gagctatgcc atgggagtag gagtggaaact 1080
 tgaaaactcc atgggaggtt tgaacttttg ccgatcttac tttgatccag catatttttag 1140
 attagggcaa gagatggtaa ggaggtcagc tggaaaggct agttccacat tggcatctga 1200
 actcggatc actgccgagg atgcaaggct tgtttcagag attgcaatgc atactactga 1260
 ggacaagatc agtagagcgg ttggaccag acaagcccaa gtatcatttc tacacggtga 1320
 tcaaagttag aatgagctac cgagattggg gggcaaggaa gataggaggg tcaaacagag 1380
 tcgaggagaa gccagggaga gctacagaga aaccggggcc agcagagcaa gtgatgagag 1440
 agctgcccac cttccaaccg gcacaccct agacattgac actgcatcg agtccagcca 1500
 agatccgcag gacagtcgaa ggtcagctga cgccctgctt aggctgcaag ccatggcagg 1560
 aatctcggaa gaacaaggct cagacacgga caccctata gtgtacaatg acagaaatct 1620
 tctagactag gtgcgagagg ccgaggacca gaacaacatc cgcctaccct ccatcattgt 1680
 tataaaaaa 1689

<210> 70
 <211> 1689
 <212> DNA
 <213> Rinderpest virus

<400> 70
 aggattcaag atcctatcga ctggagcagg ctttaaggtaa aggttcttta aaatggcttc 60
 tctcttgaag agcttagctc tgttcaaaag ggccaaagac aagccacccc ttgctgcagg 120
 ctctgtgtgg gctatccggg gaatcaaaca tgtcattgtt gttccgattc ctggggattc 180
 ctcaatcacc acaagatccc gcctcctaga ccgtctcggt aaaatgggtg gagaccaga 240
 catcagtggc cctaaattaa ccggggctct catcagcatc ttatcactgt ttgtcgagtc 300
 accaggccaa cttattcaga gaatcactga tgaccctgat atcagcatta aattgggtgga 360
 ggtagtccaa agtgacaaaa ctcaatcagg gctgacattt gcctctaggg gtacgagcat 420
 ggatgacgag gctgatagat atttcactta tgaagaaccc aatgacggag aagaaaggca 480
 gtcttactgg tttgagaatc gagatattca agacattgag atccaggatc cagaagggtt 540
 caatatgata ctggcaacca tcttagccca gatctggatc ttactagcta aagcagtcac 600
 agcccctgat actgcagccg attcagagtt acggagggtg gtgaaatata ctcaacaaag 660
 gagggtaatt ggagaattca gacttgacaa aggatggctt gacacagtgc gcaacagggt 720
 agcagaagat ctctctttac gcagatttat ggtggcattg atcttagata tcaagagaac 780
 cccaggcaat aaaccaagga tcgctgaaat gatctgtgac attgatacct acatagtgga 840
 ggtaggggtg gccagtttta tactcactat caaatttggt atagaaacga tgtaccagc 900
 actgggcctg catgaattcg ccggagagct ctccacaatc gagtctctta tgaatctgta 960
 ccagcaaatg ggtgaactgg ctcccttatat ggtgatctta gagaactcaa tccagaacaa 1020
 gttcagtgca ggagcatacc ccctgttgtg gagctatgct atggggattg ggggttgaatt 1080
 agagaattct atggggggac ttaatttttg caggctgtac tttgaccctg catatttcag 1140
 attaggacaa gaaatggtaa ggaggtcagc tgggaaggtc agctccaacc tggcatctga 1200
 gctcggcatc accgaggagg aagcaagact tgtctctgag atcgcagcat acacaagtga 1260
 tgatcggaac aatagaacct ctggacccaa acaggcccag gtttcattcc ttcgcaccga 1320
 tcaagggagt gaggcccagc acagcgcaag caagaaagat gaagctagag caccocagg 1380
 caagaaggaa accaggacca gcagcaagtc agacaagcac aaggaaggta cagacaaaga 1440
 acctgtaagc tcctcagcta tgactctgat tgatgtggac acaaccctcg aggcagatac 1500
 tgatcctcta gagagcaaga agtcagcaga ggctcttctt agactgcagg ctatggccgg 1560
 catcttaggg gactcaacct ttggcaatga cagtctgaga gcatacaacg acaaggatct 1620
 tctcaactga gtgagtgcc cgcacgcttc agcacgcaat ctcccatg c aaagcgccat 1680
 tataaaaaa 1689

<210> 71
 <211> 1689
 <212> DNA
 <213> Peste-des-petits-ruminants virus

<400> 71
 aggagtaaag atcctactgt cggggagagg aggaggagca agatctttga ccatggctac 60
 tctccttaaa agcttggcat tgttcaagag gaacaaagac aaagcgcta ctgcgtcggg 120
 ttcaggaggg gccatccggg ggattaagaa tgttatcata gtcccatc cgggggactc 180
 atccatcatt acccgttcaa gactgctcga caggcttgct agattggccg gagatcctga 240
 catcaacggg tcaaagctga ccggcgtgat gatcagcatg ttatctttgt tcgtggagtc 300
 acccgggcaa ttgatacagc ggatcacaga tgatccagat gttagcatcc gccttggtga 360
 ggtagttaa agtactaggt cccagtccgg gttgacctt gcatacagtg gtgctgattt 420
 ggacaatgag gcagatatgt atttttcaac tgaaggaccc tcgagtggaa gtaagaaaag 480
 gatcaactgg tttgagaaca gagaaataat agacatagag gtgcaagatg cagaagagtt 540
 caatatgttg ttagcctcca tcttagcaca agtttgatc ctccctggcca aggcgggttac 600
 ggacccggat acggcagctg actcagaact gagaagggtg gttaaatata cacaacaaag 660
 gagagtgatt ggggaatttc gccttgacaa aggggtggctg gacgcagtc gcaacaggat 720
 tgcaagaat ctatcacttc ggcggttcat ggtatctctc atacttgaca tcaaaaggac 780
 ccccggaac aagccaagga ttgcagaaat catctgcagc attgacaact atattgtaga 840
 agcgggactc gccagtttca ttcttactat caaatttggt attgaaacca tgtatcctgc 900
 attaggcctt cacgagttcg ccggggaatt gtccactatt gaatccttga tgaacttgta 960
 tcaacagcta ggagaggttg caccctacat ggtgattcta gagaactcaa ttcagaacaa 1020
 gtttagtgca ggagcctatc ctctcctctg gagctatgag atgggtgtcg gagtgcagtt 1080
 ggagaactca atggggggcc tgaacttttg caggctcatat tttgaccgg cctatttcgg 1140

13

tctcggacag	gagatggtca	gaagatctgc	aggaaaggtc	agctctgtaa	tcgcggtcta	1200
gcttgggtatc	acagcagagg	aagccaaact	agtctcggaa	atcgccctcac	agactgggga	1260
tgaacgaacc	gtcagagggga	ctgggcctcg	acaggcgag	gtctccttcc	tccagcataa	1320
aacagatgag	ggagagtgcg	ctacaccagc	gaccagagaa	gaagtcaaaag	ctgcgatccc	1380
aaatgggtcc	gaaggaagg	acacaaagcg	aacacgctca	ggaaaagccca	gaggagaaac	1440
tcccggccaa	ctgcttccgg	agatcatgca	agaggatgaa	ctctcgcgag	agtctagtca	1500
aaaccctcgt	gaggctcaaa	gatcggtcga	ggcactcttc	aggctgcagg	ccatggccaa	1560
gattctggag	gaccaggagg	agggagaaga	caacagtcag	atctacaacg	acaaggatct	1620
cctcagctga	gcagacgcac	cctccgtcca	aatcagtgac	aagacatcgc	ccgccagtat	1680
tataaaaaa						1689

<210> 72
 <211> 1683
 <212> DNA
 <213> canine distemper virus

<400> 72	
agggtcaatg	atcctacctt
ccttcttaaa	agcctcacac
ctccggggga	gcaataagag
aagcattggt	acaagatctc
aatcaacggc	cctaaattaa
ccctggacag	ttgatccaga
ggtaatacca	agcatcaact
ggattctgag	gcagatgagt
attaggctgg	ttagagaata
caatatattg	ctagcttcca
tgtcctgat	actgcagccg
acgtgtggtc	ggagaattta
tgtcgaggac	ctatctttga
cccagggaac	aagcctagaa
agctgggtta	gctagtttca
tcttgggttg	catgagtttt
tcaacagatg	ggtgaaacag
athtagtgca	gggtcctacc
tgaaaactcc	atggggagggt
actcgggcaa	gaaatgggtta
gcttggcatc	accaaggagg
ggaccggaca	attcgagcta
aagatccgaa	gtcgccaatc
aggagacaaa	taccccatct
caacagttct	gaattggagt
tgacgatgat	cggaatacga
cagtcaacct	gggaccagtg
ttaaatatct	aagaccagtc
aaa	

<210> 73
 <211> 1680
 <212> DNA
 <213> Phocine distemper virus

<400> 73	
gggtcaatgat	ccgtctcaag
tctcaaaaagc	ctgagcttgt
tggcggggca	ataagaggga
cattgttaact	agatcaagac
tagtgggtccc	aagttgaccg
tggaacagta	attcagagaa
aatacccagt	attaattcta
tgctgaagct	gatgagtttt

14

gggctgggta	gaaaataaag	atataatcga	catcgagggtg	aatgacgcag	agcagttcaa	540
tatcttacta	gcgtcaatcc	tggctcaaat	ctggatcttg	cttgccaagg	ctgtaactgc	600
tccagacact	gcggctgatt	cagaaatgag	aagatggatt	aagtacactc	agcagagacg	660
tgtgatagga	gaatttagaa	tgaataaaat	atggcttgat	atagttagga	acagaattgc	720
tgaggatttg	tctttgaggc	gatttatggt	ggcattaata	ttagatatca	aaaggctctc	780
gggcaataaa	ccaagaattg	ccgaaatgat	ctgtgatata	gacaactata	tagtagaagc	840
tggcctggca	agctttatct	taactatcaa	atltggcatc	gaaactatgt	acccggcact	900
tggctacat	gagttctctg	gagagttgac	aaccattgaa	tcacttatgg	ttttatatca	960
acagatgggt	gaaacggcac	cgtatatggt	gattcttgag	aactcagttc	agaataaatt	1020
cagtgcaggc	tcttatccgt	tgctttggag	ttatgctatg	ggagtcgggg	tcgagcttga	1080
gaattccatg	ggagggttaa	acttcggctc	atcttacttt	gaccagctt	acttccgact	1140
tggctcaagaa	atggtcagga	gatctgctgg	taaagtgagc	tctacatttg	cggccgaatt	1200
tggcatcacc	aaagaggagg	cgcaactagt	gtcagaaata	gtatcaagaa	caaccgaaga	1260
tagaacaact	agggcaactg	gtcctaataa	atcccagatc	acatttctac	actctgaaag	1320
aaatgaagca	cctaaccaaa	gactccctcc	catcaccatg	aagtctgaat	tccaaggagg	1380
tgataagtat	tccaatcagc	tcattgatga	tcggctgtct	gggtatactt	ctgatgttca	1440
atcatctgaa	tgggacgagt	cacgccagat	cacacaattg	acacaggaag	gggaccatga	1500
caatgatcaa	caatcaatgg	acggctctcg	caaaatgaga	cagctcacca	agattctaaa	1560
tcagtcagat	acaaatgggg	aggtctcccc	tgctcataat	gacagggacc	tgctcagcta	1620
agttccaaaa	gacattgcag	aatcaaatga	aacatgcata	ttcaagccaa	ttataaaaaa	1680

<210> 74

<211> 1683

<212> DNA

<213> Dolphin morbillivirus

<400> 74

aggattaatg	atcctatcaa	ttggcacag	atltggataa	aggttcacag	tcattggcgac	60
acttcttcgg	agtctagctc	tgttcaagag	gaacaaagat	agaacacccc	taattgcagg	120
ttcaggagga	gccataagag	ggattaagca	tgttatcgta	gtcccagtac	ccggtgattc	180
atcgattgtc	actagggtcaa	gattattgga	cagggttagta	agacttgctg	gtgaccctta	240
tataagtggg	cctaagctga	caggcgctcat	gatcagtata	ctatcattgt	ttgttgaatc	300
accaggtcaa	ctaatacagc	gaatcactga	cgacccagat	gtcagcatca	gattagttga	360
agtaatccaa	agtgagaagt	ccctatcagg	gctcactttt	gcatccagag	gcgctaatat	420
ggaggatgag	gcggatgact	atltctctat	tcaagcaggg	gaggaaaggg	acaccagagg	480
aaccatttg	tttgagaaca	aagagatagt	tgaattgag	gttcaagacc	cagaagaatt	540
caacatacta	ttggcatcta	ttcttgacaa	aatltggatc	ctattagcca	aggcagtcac	600
tgtctcagat	actgcagctg	actccgagac	gaggcggttg	attaaatata	ctcagcaacg	660
ccgtgtagtg	ggtgagtttc	ggcttgacaa	gggatgggtg	gatgctgtga	gaaatcggat	720
tgcggaggac	ctatcgttga	ggagattcat	ggtggcatta	atlttagata	tcaagagaac	780
accagggaac	aaaccagga	ttgccgagat	gatatgcgac	atagacacct	atatcgtcga	840
ggcaggtctt	gctagcttca	tcctaactat	caaattcggg	atcgaaacaa	tgtacccggc	900
cttaggggtg	catgaattct	cgggtgaatt	aactacagtt	gagtctctaa	tgaacctcta	960
ccaacagatg	ggcgagactg	caccgtacat	ggtaattctt	gaaaactcaa	ttcagaacaa	1020
gttcagtgca	ggttcatacc	cgctattatg	gagctatgca	atgggagttg	gagttgaact	1080
tgaatttca	atgggtggac	ttaatlttg	tcgttcttac	ttcgaccctg	catatlttcag	1140
actgggtcaa	gagatgggtc	ggagatcagc	aggcaagggtg	agctcatcgc	tagccgcaga	1200
actagggatc	acagccgagg	acgccaaact	tgtctccgag	attgctgcgc	aggctaata	1260
cgacagagct	aataagagca	taggtcccaa	acaaaaccag	atatcgtttc	ttcatcctga	1320
cagaggcgat	gccagtactc	cagggaacat	ccttcgcgca	aacgaggggtg	acgggtccac	1380
ccggatgaaa	agagggggga	acattgctac	acaaaagggtg	acaagcatag	atcagacatc	1440
aacgactctc	agcaaagaca	ctctagacat	tgatgaacag	tccgacaaca	ctgacgacct	1500
aattagtatc	caaaaatcag	ctgaggcatt	agccaagatg	agagccatgg	ccaagctatt	1560
ggaaaaccaa	ggcccgcgtg	atgtcactgc	gcacgtttat	aatgataaag	atctacttgg	1620
ctgaacaaaa	ggatccactc	tgagcagcgt	cagactttgt	atlttcatca	atattacaaa	1680
aaa						1683

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL KOSCHEL K ET AL: "MEASLES VIRUS ANTISENSE SEQUENCES SPECIFICALLY CURE CELLS PERSISTENTLY INFECTED WITH MEASLES VIRUS" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS,ORLANDO, US, vol. 207, no. 1, 20 février 1995 (1995-02-20), pages 168-178, XP000575957 ISSN: 0042-6822	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	